

UNIVERSITA' DI PISA



Dipartimento di Farmacia

Corso di Laurea Specialistica in Farmacia

Tesi di Laurea

**RUOLO DEL PEPTIDE CGRP NELLA
FISIOPATOLOGIA DELL'EMICRANIA
E ANTAGONISTI DEL RECETTORE
CGRP COME FARMACI ANTIEMICRANICI**

Relatore:

Dott.ssa Francesca Simorini

Candidata:

Giulia Gambogi

Correlatore:

Prof.ssa Annalina Lapucci

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

Alla mia famiglia, Matteo

Capitolo 1 Descrizione della patologia

Introduzione	4
1.1 Che cos'è l'emicrania	5
1.2 Farmacoterapia dell'emicrania	6
1.3 Fisiopatologia dell'emicrania	9
1.4 Caratteristiche cliniche, eziologiche e attivazione dell'emicrania	12
1.4.1 Sintomi premonitori	14
1.4.2 Fase dell'aura	14
1.4.3 Fase del mal di testa	15
1.4.4 Postdromi	17

Capitolo 2 Peptide CGRP

2.1 Peptide correlato al gene della Calcitonina (CGRP, Calcitonin Gene Related Peptide)	18
2.2 Struttura del peptide α -CGRP	19
2.3 Distribuzione e localizzazione del CGRP	21
2.4 Funzioni fisiologiche di CGRP	22

Capitolo 3 Recettore CGRP

3.1 I recettori accoppiati a proteine G (GPCR)	24
3.2 Il recettore per CGRP	26
3.2.1 CLR	27
3.2.2 RAMP 1	30
3.2.3 Interazione CLR e RAMP 1	35
3.2.4 RCP	37
3.3 Meccanismo con cui CGRP si lega al proprio recettore	37

Capitolo 4 Trasduzione del segnale

4.1 Trasduzione del segnale da parte dei GPCR 39

4.2 Meccanismo di trasduzione del segnale del recettore CGRP 41

Capitolo 5 CGRP e emicrania

5.1 Il peptide correlato al gene della calcitonina e l'emicrania 46

5.2 Il peptide correlato al gene della calcitonina e il suo ruolo nella
fisiopatologia dell'emicrania 47

5.2.1 Fonti cerebrovascolari del peptide correlato al gene della calcitonina
(CGRP) 47

5.2.2 Localizzazione dei recettori per CGRP rilevanti per l'emicrania 48

5.2.3 Ruolo funzionale del CGRP cranico e i suoi recettori 50

5.2.4 CGRP e ossido nitrico 51

5.2.5 CGRP è rilasciato durante un attacco di emicrania? 53

5.2.6 L'inibizione del rilascio di CGRP è un'opportunità terapeutica? 54

Capitolo 6 Antagonisti del recettore CGRP

6.1 Scoperta degli antagonisti del recettore CGRP 58

6.2 Selettività di specie degli antagonisti del recettore CGRP-Ruolo di
RAMP1 66

6.3 Determinanti molecolari per il legame degli antagonisti 69

6.4 Indagini cliniche 73

Olcegepant 73

Telcagepant 74

Capitolo 7 Sintesi Telcagepant

7.1 Prima via di sintesi del Telcagepant 76

7.2 Seconda via di sintesi del Telcagepant 83

Conclusioni	86
Riferimenti bibliografici	87

CAPITOLO 1

Introduzione

Il Mal di testa o cefalea è definito come un dolore alla testa sopra la linea orbito-meatale, che a volte si manifesta anche con dolore nella parte superiore del collo (Villalón e Olesen, 2009).

La testa è una delle sedi di dolore più comuni nel corpo e alcune delle cause delle cefalalgie sono benigne, mentre altre rappresentano vere e proprie emergenze mediche.

I Mal testa sono classificati e definiti sulla base di espliciti criteri diagnostici dalla *International Classification of Headache Disorders* (Committee, 2004).

Ci sono tre principali categorie di mal di testa:

mal di testa primari;

mal di testa secondari;

nevralgie craniche, dolori facciali e mal di testa non classificabili.

Le Cefalee primarie, che comprendono emicrania, cefalea tensiva, cefalea a grappolo e altre cefalee, possono essere definite come disturbi indipendenti non causati da un'altra malattia o trauma (Committee, 2004). Anche se le cefalee primarie non sono pericolose per la vita di per sé, provocano una qualità molto ridotta della vita, sofferenza e un alto costo finanziario personale e sociale. Le conoscenze sulle loro basi fisiopatologiche sono in costante aumento, ma molto rimane ancora da indagare. Al contrario, le cefalee secondarie sono un sintomo di una malattia di base o lesioni che devono essere diagnosticate e trattate poiché molte di esse, quali meningite, encefalite, ipertensione, emorragia cerebrale, tumore, disidratazione, possono essere potenzialmente pericolose per la vita.

Infine, le nevralgie craniche si verificano a causa di un'improvvisa iperattività dei nervi sensoriali cranici, prevalentemente del nervo trigemino.

La complessità dell'argomento rende impossibile trattare in modo esaustivo in un unico elaborato tutte le categorie di mal di testa, le loro cause, sintomi e trattamenti: il presente lavoro di tesi si concentrerà sull'emicrania e in particolare sul ruolo del neuropeptide correlato al gene della α -calcitonina (*Calcitonine Gene-Related Peptide*, CGRP) nella fisiopatologia dell'emicrania e sull'efficacia di antagonisti del recettore CGRP come farmaci antiemicrania.

1.1. Che cos'è l'emicrania

L'emicrania è un disturbo neurovascolare caratterizzato da una grave, debilitante cefalea pulsante unilaterale associata ad anoressia, nausea, vomito, fotofobia, fonofobia e/o diarrea (Goadsby *et al.*, 2002). Il dolore pulsante solitamente aumenta con le normali attività di routine. E' una condizione invalidante, con sintomi caratteristici che può durare da poche ore a diversi giorni. E' un disturbo neurologico e disabilitante comune: secondo una stima ne è afflitto l'11% della popolazione adulta mondiale. L'incidenza varia da 6 a 9% tra gli uomini e da 15 a 17% tra le donne.

Il secondo maggior fattore associato alle cause di emicrania dopo il genere è l'età. L'emicrania aumenta con l'età, con un picco negli anni centrali (40-50 anni) per poi diminuire.

La Società Internazionale delle Cefalee (Committee, 2004) attualmente riconosce sei varianti di emicrania, ma i tipi più comuni sono:

(I) emicrania con aura, cioè insorgenza con sintomi visivi, sensoriali, a carico della parola, motori, seguiti da mal di testa, un tempo chiamata emicrania "classica";

(II) emicrania senza aura, in cui il mal di testa è simile a quello dei pazienti con aura, ma non è preceduto da essa, un tempo chiamata emicrania "comune".

È degno di nota che non tutti gli episodi di aura sono seguiti da mal di testa: si parla in tal caso di "aura senza mal di testa" (Committee, 2004).

1.2. Farmacoterapia dell'emicrania

Cenni storici

La storia del trattamento del mal di testa in generale, e dell'emicrania in particolare, attraversa i millenni. Le prime descrizioni di emicrania risalgono all'epoca dei Sumeri (circa 3000/4000 a.C). Trattamenti primitivi comprendevano la trapanazione, in cui veniva effettuato un foro nel cranio nel tentativo di alleviare il dolore (Williams *et al.*, 2009).

Il trattamento razionale per questo antico disturbo si è evoluto lentamente. Un tempo il mal di testa veniva considerato una malattia dalle cause soprannaturali, poi si è passati a definirlo come un disturbo neuro vascolare (Villalón e Olesen, 2009).

La caffeina è stata probabilmente il primo agente farmacologico per il trattamento dell'emicrania, ed è probabile che la disponibilità e la prevalenza di caffè nel XVII secolo in Inghilterra abbiano contribuito a rendere popolare questo rimedio. Duecento anni dopo è stata scoperta la proprietà di estratti di Ergot di lenire alcuni tipi di mal di testa. L'uso di questo tipo di medicamento si è diffuso ulteriormente quando è stata ottenuta ergotamina pura, come tartrato, nel 1918; nel 1925 è stato effettuato con successo il trattamento dell'emicrania con ergotamina (ET) per iniezione sottocutanea. Idrogenazioni del doppio legame in posizione 9-10 produssero diidroergotamina (DHT), meglio tollerata di ET ed efficace nel trattamento dell'emicrania. Successivamente è stato scoperto che sia ET che DHT si legano con alta affinità ai recettori per la serotonina, noradrenalina e dopamina. Poiché sono stati riportati eventi avversi rari ma potenzialmente gravi, l'uso di ET e di DHT è controindicato in pazienti con malattie cardiovascolari (Williams *et al.*, 2009).

Farmaci antiemicrania

Estratti di Ergot e diidroergotamina sono stati quindi per molto tempo i primi rimedi specifici per il trattamento degli attacchi di emicrania acuta, fino all'avvento dei triptani (Edvinsson *et al.*, 2012).

La scoperta di agonisti sottotipo-selettivi della serotonina noti come triptani migliorò significativamente le opzioni di trattamento. Introdotta per la prima volta nel 1993, questa classe di farmaci specifici rivoluzionò la terapia contro l'emicrania. I triptani si legano e attivano i recettori 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} producendo la vasocostrizione dei vasi sanguigni del cranio e il blocco del rilascio di peptidi infiammatori nei neuroni sensoriali. Sono biodisponibili per via orale, comodi da dosare e generalmente ben tollerati. Questi farmaci sono sicuri se usati in modo appropriato, ma sono controindicati nei pazienti con malattie cardiovascolari in quanto provocano vasocostrizione (Williams *et al.*, 2009).

Altri effetti collaterali, come vertigini, nausea, affaticamento, sintomi toracici e parestesie limitano l'uso dei triptani in alcuni pazienti. Inoltre, un certo numero di pazienti non risponde bene ai triptani (Villalón e Olesen 2009).

Negli ultimi 10 anni sono state individuate diverse molecole segnale e i meccanismi secondo i quali insorge l'emicrania sono diventati più chiari; per questi motivi, molti nuovi trattamenti sono ancora in corso di studio.

Tra gli antagonisti della serotonina troviamo gli antagonisti del recettore 5-HT_{1F}. Dato che questo recettore si trova sulle terminazioni nervose centrali e periferiche dei neuroni sensoriali del trigemino, questi farmaci sembrano non avere gli effetti vasocostrittori degli altri membri della famiglia. Essi agiscono iperpolarizzando le terminazioni nervose e quindi inibiscono gli impulsi del trigemino.

Nel trattamento di attacchi acuti di emicrania vengono anche usati farmaci “non specifici” ovvero FANS e analgesici. Questi vengono usati nel trattamento dell’emicrania di grado lieve o moderato.

Tra questi troviamo acido acetilsalicilico in dosi superiori ai 1000 mg, paracetamolo (1000 mg) ibuprofene (200-800 mg) e indometacina (50-100mg).

Ad oggi l’ibuprofene è il farmaco di prima scelta, in quanto è efficace anche a dosi che vanno da 200-400 mg contro i 1000 mg di aspirina e paracetamolo.

I farmaci sino ad ora elencati sono usati per il trattamento acuto, ma bisogna considerare il fatto che alcuni pazienti necessitano anche di un trattamento profilattico con farmaci assunti su base giornaliera al fine di ridurre il numero o per lo meno la gravità degli attacchi (Olesen e Ashina, 2011).

I farmaci usati per un trattamento profilattico vanno dai beta-bloccanti ai farmaci antiepilettici; possiamo anche citare altri rimedi come la tossina botulinica e potenziali inibitori della depressione corticale diffusa (CSD) (par. 1.4.2), come tonabersat (Olesen e Ashina, 2011).

Tra i nuovi trattamenti troviamo gli inibitori dei recettori del peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP), che vedremo più avanti nel dettaglio.

Dopo il successo dei triptani, cominciarono a sommarsi evidenze sperimentali di collegamenti tra il peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP) e la fisiopatologia dell’emicrania.

CGRP era stato identificato come un neuropeptide vasoattivo in gran parte espresso nei neuroni sensoriali. È stato osservato che i livelli plasmatici di CGRP sono elevati durante l’emicrania, e che il trattamento con un triptano è in grado di ripristinarne i livelli basali. Questa osservazione, insieme ad altre prove, ha suggerito che gli antagonisti del recettore CGRP potrebbero risultare utili farmaci antiemicrania. Poiché gli antagonisti del recettore CGRP non sono vasocostrittori diretti, è stato suggerito che possano non provocare gli effetti avversi cardiovascolari dei triptani, con notevole vantaggio terapeutico.

Una prova del concetto è stata ottenuta con il potente antagonista del recettore CGRP, BIBN4096BS (Olcegepant), dimostratosi efficace, per somministrazione endovenosa, nel trattamento di emicrania acuta nel corso degli studi clinici.

Un obiettivo concreto è stato quello di identificare un antagonista del recettore per CGRP che fosse biodisponibile per via orale per consentire una più semplice somministrazione ai pazienti. Questo obiettivo è stato al centro di un lavoro di ricerca chimico-farmaceutica che ha portato alla scoperta di MK-0974 (Telcagepant), un antagonista del recettore CGRP che può essere assunto per via orale (Williams *et al.*, 2009).

1.3. Fisiopatologia dell'emicrania

Anche se le teorie dell'emicrania hanno di solito individuato nei vasi sanguigni cerebrali l'origine degli attacchi, ipotesi più recenti localizzano la sede di disfunzione primaria nei centri del tronco encefalico che regolano il tono vascolare e la sensazione del dolore. (Goadsby, 2007). Strutture sensibili al dolore come i vasi sanguigni intracranici e le meningi, in particolare la dura madre, sono dotati di fibre nervose sensoriali dal ramo oftalmico della prima branca del nervo trigemino. In particolare, per i centri attivi dell'emicrania ci si riferisce all'interazione tra la parte oftalmica del nervo trigemino con la dura madre e i vasi craniali (Goadsby, 2007).

Essi originano da neuroni pseudounipolari situati nel ganglio trigeminale, che si proiettano verso neuroni sensori di secondo ordine nel nucleo caudale trigeminale del tronco encefalico e le sue estensioni a valle fino al livello C2 chiamato "complesso trigemino-cervicale (Goadsby, 2007).

Da questa regione, un segnale viene trasmesso al talamo ventro-posteriore con attivazione di aree corticali, tra cui la corteccia frontale, l'insula e la corteccia cingolata, che si traduce nell'esperienza del dolore (Goadsby, 2007).

Inoltre, una regione attiva nell'emicrania è stata evidenziata nel tronco cerebrale mediante la tomografia ad emissione di positroni (PET).

Così, il sistema trigemino-cerebrovascolare sembra essere coinvolto sia a livello del tronco encefalico sia a livello delle terminazioni nervose perivascolari (Olesen *et al.*, 2009).

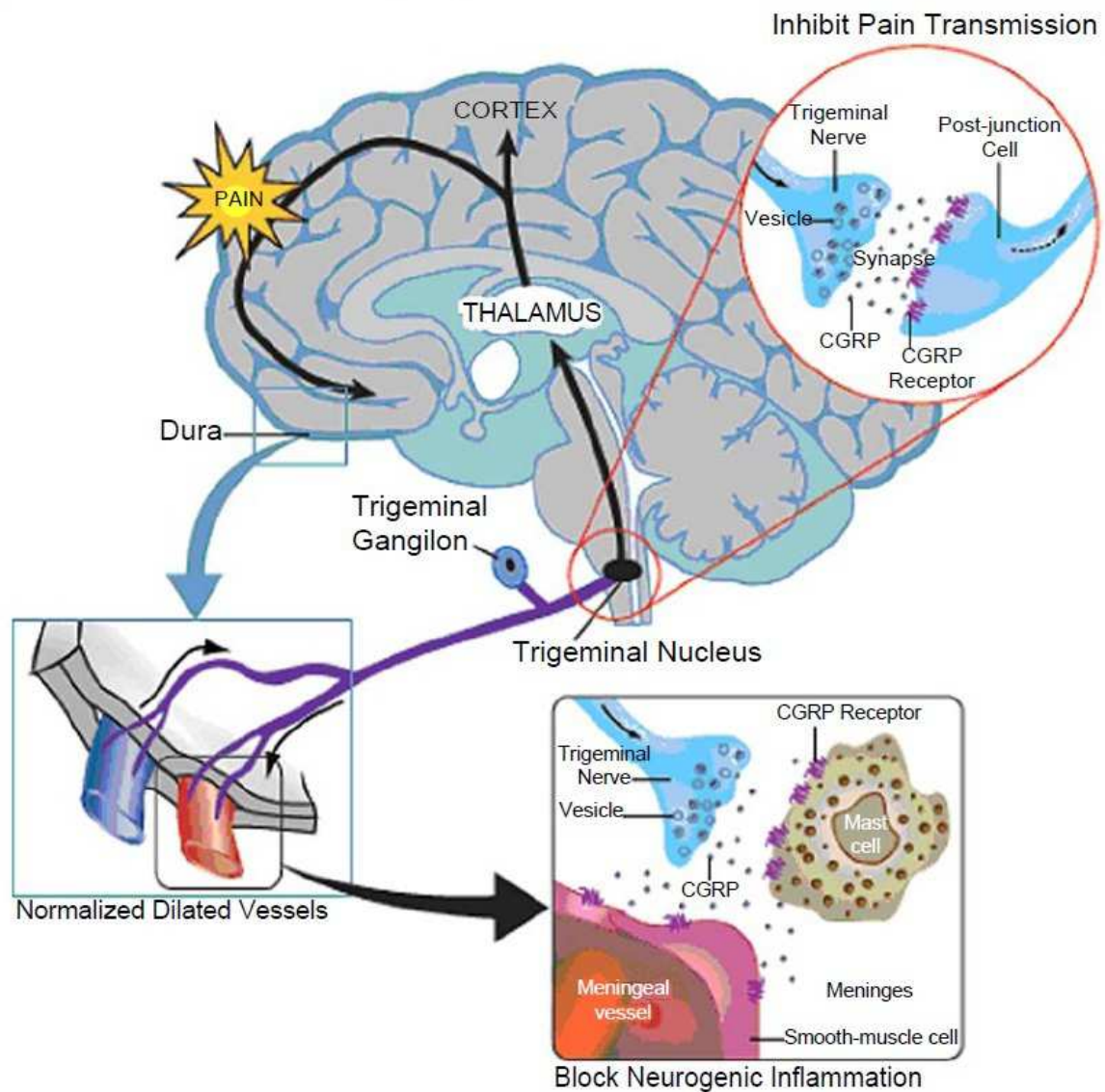


Figura 1.1. Potenziali siti di azione degli antagonisti del recettore CGRP (Williams *et al.*, 2009)

Come sarà discusso più avanti, CGRP è abbondante sia nelle fibre perivascolari che nel nucleo spinale del nervo trigemino, ma non è noto se uno, l'altro o entrambi i siti siano importanti per l'azione dei bloccanti del recettore CGRP nell'emicrania.

I cambiamenti vascolari, seppur riscontrati, sembrano essere secondari ai meccanismi neuronali.

Le terminazioni presinaptiche del nervo trigemino contengono dei neuropeptidi, come la sostanza P e il peptide correlato al gene della calcitonina, che al rilascio provocano uno stato infiammatorio che interessa i vasi sanguigni. Questo implica dilatazione dei vasi, formazione di essudato, attivazione dei mastociti e degranulazione.

La figura 1.2. illustra le possibili strutture nel cervello coinvolte nell'emicrania:

- (I) l'arteria meningea, circondata dai nervi perivascolari e associata ai mastociti nelle meningi,
- (II) le grandi arterie cerebrali,
- (III) il nervo trigemino dalle arterie meningee e cerebrali e dei gangli trigeminali (TG) al nucleo caudale del trigemino (TNC),
- (IV) il TNC che convoglia i segnali nocicettivi ai centri superiori del dolore, come il talamo e corteccia. L'attivazione dei nervi trigeminali può anche causare il rilascio di neuropeptidi, tra cui CGRP, sulle terminazioni nervose sensoriali che, a loro volta, possono provocare l'attivazione di strutture post-sinaptiche come il tronco encefalico e la dilatazione delle arterie meningee (Gupta e Villalón, 2010).

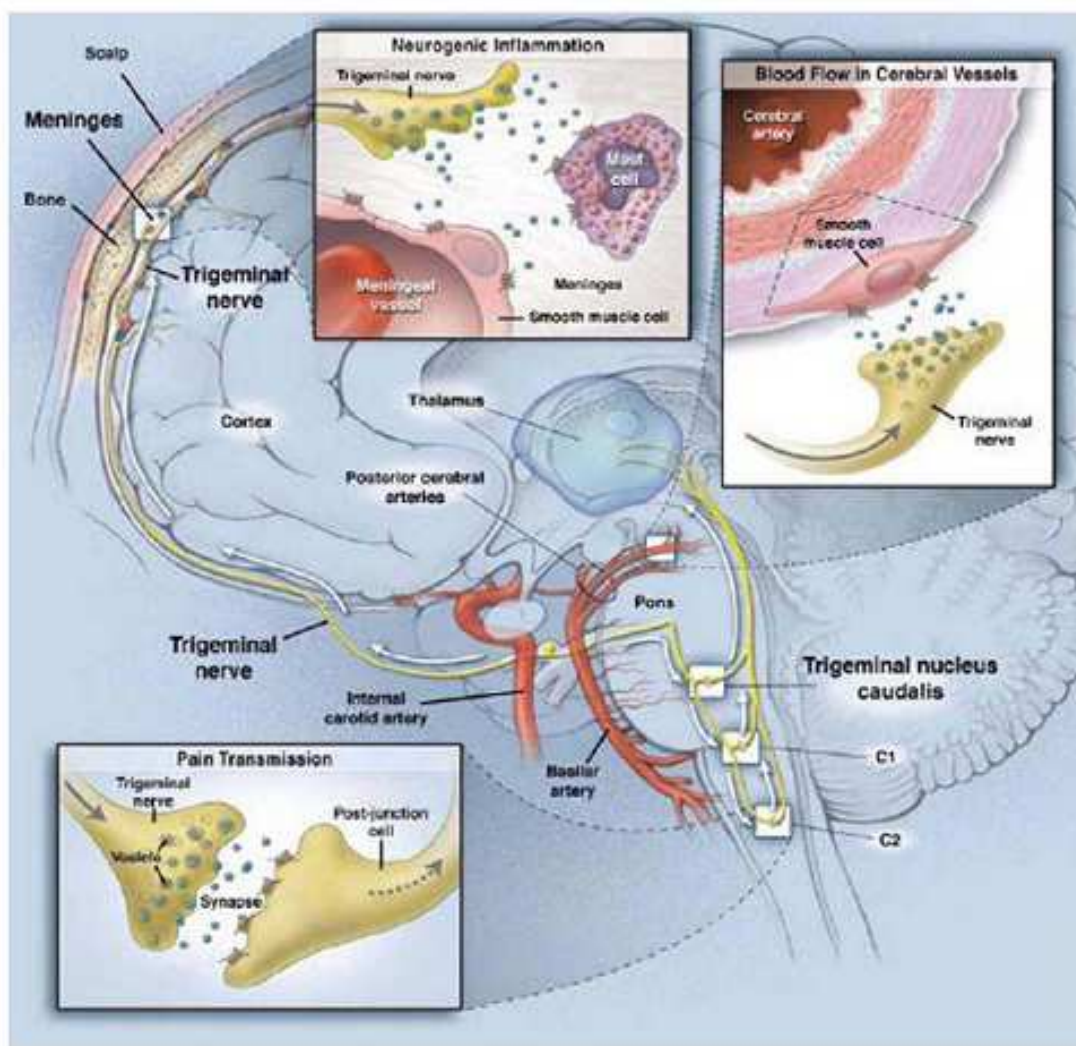


Figura 1.2. Possibili strutture nel cervello coinvolte nell'emicrania (Gupta e Villalón., 2010)

1.4. Caratteristiche cliniche, eziologia e attivazione dell'emicrania

Sulla base delle caratteristiche cliniche, sono distinte quattro fasi diverse di emicrania, che non sono però sempre presenti in tutti i pazienti (Figura 1.3.): i sintomi iniziali o premonitori (quando presenti), l'aura emicranica (quando presente); la fase di mal di testa e la fase dei postdromi, che compare dopo che il mal di testa è cessato.

Gli studi condotti nei gemelli suggeriscono che il rischio emicrania sia influenzato da fattori genetici e ambientali. Infatti, i pazienti con forme comuni

di emicrania, in particolare emicrania con aura tipica (MA) ed emicrania senza aura (MO), hanno una eredità complessa, ma i geni implicati restano sconosciuti.

Sebbene alcuni attacchi di emicrania possano essere spiegati da fattori ambientali quali l'assunzione di vino rosso, l'esposizione a luce solare molto intensa o lo stress, la grande maggioranza degli attacchi rimane inspiegabile.

Le conoscenze sui meccanismi dell'emicrania sono state notevolmente migliorate da esperimenti di provocazione nell'uomo.

I pazienti affetti da emicrania, ma non i soggetti normali di controllo, sviluppano un mal di testa simile a emicrania, o addirittura attacchi identici a quelli spontanei, dopo infusione endovenosa di nitroglicerina (*glyceryl trinitrate* GTN, donatore di ossido nitrico NO) (Figura 1.4), di istamina, di CGRP, del polipeptide attivatore dell'adenilato ciclasi ipofisaria (*Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide*, PACAP) e di prostaciclina (Villalòn e Olesen 2009).

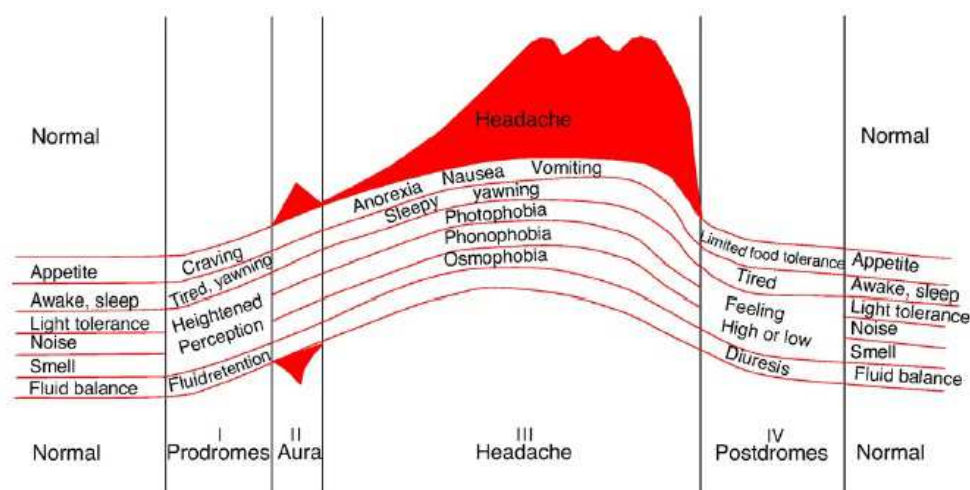


Figura 1.3. Le quattro fasi dell'attacco di emicrania e i sintomi caratteristici di ogni fase (Villalòn e Olesen 2009)

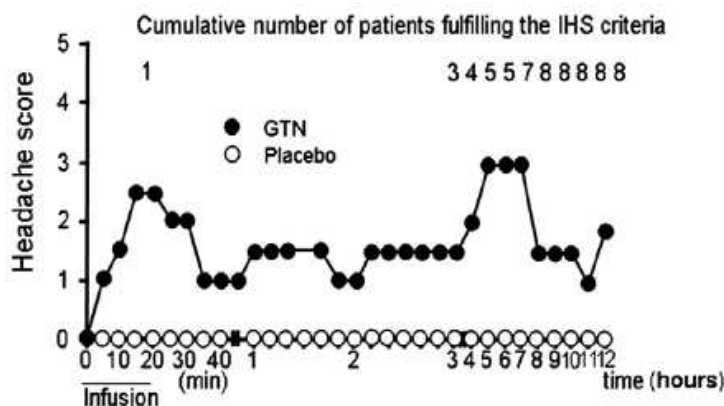


Figura 1.4. Grafico della provocazione di un attacco di emicrania attraverso l'infusione di GTN (Villalòn e Olesen 2009)

1.4.1. Sintomi premonitori

Alcuni pazienti con o senza aura hanno sintomi di allerta precoce, chiamati sintomi premonitori, che comprendono stanchezza, iperattività, voglia di certi cibi, sbadigli e sensazione di depressione.

La natura dei sintomi suggerisce una possibile attivazione dell'ipotalamo, ma non sono state effettuate misure di parametri patofisiologici durante questa fase. Attacchi GTN-indotti hanno provocato anche sintomi premonitori (Villalòn e Olesen 2009).

1.4.2. Fase dell'aura

Un terzo dei pazienti con emicrania ha attacchi con aura sia esclusivamente che alternati ad attacchi senza aura. Studi del flusso ematico cerebrale regionale (*regional Cerebral Blood Flow*, rCBF) hanno dimostrato che l'aura, associata a diminuzione del flusso occipitale che diffonde lentamente in avanti, è causata da una depressione corticale diffusa (*Cortical Spreading Depression*, CSD), un ben noto fenomeno sperimentale animale che consiste in una depolarizzazione di

tutti gli elementi cellulari corticali che si diffonde lentamente e non si trasmette all'altro emisfero (Villalón e Olesen, 2009).

1.4.3. Fase del mal di testa

Nei pazienti con aura spesso il mal di testa inizia mentre rCBF è ridotto e continua anche quando questo aumenta. Nei pazienti senza aura, rCBF è focalmente aumentato nel tronco encefalico, mentre a livello corticale il flusso di sangue è normale, ad eccezione di zone attivate da dolore di qualsiasi genere. Pertanto, non è stata osservata nessuna manifestazione corticale specifica del mal di testa emicranico e i marcati cambiamenti, indicativi di depressione corticale diffusa, visti nei pazienti con aura sono completamente assenti.

Le arterie cerebrali ed extracraniche possono essere leggermente dilatate sul lato dolente ma un recente studio angiografico non ha rilevato differenze nel diametro dell'arteria media meningea e dell'arteria media cerebrale durante e al di fuori dell'attacco emicranico indotto.

Di conseguenza, il grado e persino l'esistenza di vasodilatazione durante l'emicrania sono stati messi in dubbio. È evidente, tuttavia, che tutte le sostanze capaci di indurre un attacco di emicrania sono vasodilatatori. Alcune di queste sostanze, come NO e CGRP, sono attive in tutto l'attacco di emicrania, perché il blocco della loro produzione o dei recettori è efficace nel trattamento di attacchi di emicrania spontanei.

Coerentemente con questi risultati, studi più recenti hanno mostrato che l'attivazione dei recettori CGRP può aumentare l'espressione della forma di NO sintasi inducibile (iNOS) e stimolare rilascio di NO dalle cellule gliali del ganglio trigeminale. Quindi, CGRP rilasciato dai corpi cellulari dei neuroni del trigemino potrebbe promuovere e mantenere un ciclo infiammatorio all'interno del ganglio che media la sensibilizzazione periferica; questo meccanismo può

offrire un'altra spiegazione plausibile di come NO e CGRP siano coinvolti nel causare un attacco di emicrania in alcuni individui.

CGRP dato per infusione endovenosa può indurre un attacco di emicrania, ma CGRP non attraversa la barriera emato-encefalica.

L'antagonista selettivo del recettore CGRP Olcegepant non è riuscito a bloccare l'effetto del rilascio di CGRP sulle arterie piali dopo stimolazione elettrica nel ratto. Inoltre, in un sistema di perfusione che utilizzava arterie piali isolate, l'arteria si dilatava solo quando CGRP veniva somministrato a livello abluminale.

Quindi, vasodilatazione e meccanismi extracerebrali rimangono molto importanti nell'emicrania, ma la teoria vascolare classica è ormai superata: se l'emicrania è stata considerata neurovascolare in origine, recentemente è stato rivolto particolare interesse verso possibili meccanismi centrali come un'attivazione ipotalamica o, più probabilmente, del tronco encefalico.

Così, alcuni autori ritengono che la vasodilatazione nell'emicrania da parte degli agenti provocanti possa essere un fenomeno parallelo o un marker surrogato del processo di emicrania vero e proprio. In effetti, è stato proposto che non vi sia alcun ingresso sensoriale anormale nell'emicrania, e che il meccanismo del dolore sia interamente centrale. Altri autori contestano questo punto di vista, giudicandolo piuttosto radicale. Un altro fattore attualmente indagato è la sensibilizzazione delle vie nocicettive periferiche e centrali nella testa.

Si presume che la sensibilizzazione periferica avvenga intorno alle arterie craniche nei terminali del trigemino, ma il modo preciso in cui il fenomeno cominci nei pazienti senza aura rimane sconosciuto, mentre nei pazienti con aura si suppone che sia dovuto alla depressione corticale diffusa, probabilmente mediante l'attivazione di metalloproteasi della matrice e apertura della barriera emato-encefalica: questo consentirebbe ai cambiamenti chimici della corteccia durante la CSD di raggiungere i nocicettori nella dura madre.

La sensibilizzazione centrale si verifica alla prima sinapsi nel nucleo spinale trigeminale del tronco encefalico come pure ai centri superiori.

E' la combinazione di sensibilizzazione periferica e centrale con la vasodilatazione cranica che la maggior parte dei ricercatori considerano responsabile del dolore emicranico.

I triptani interagiscono con questo sistema a diversi livelli, producendo: (I) la stabilizzazione di terminazioni nervose periferiche inibenti, tra gli altri, il rilascio di CGRP, (II) inibizione della trasduzione del segnale alla prima sinapsi e (III) di costrizione di vasi cranici e di altri vasi sanguigni.

Al momento è ancora in discussione l'eventuale esistenza di ulteriori effetti centrali importanti (Villalón e Olesen, 2009).

1.4.4. Postdromi

Dopo il sollievo dal dolore alcuni, ma non tutti, i pazienti ancora non si sentono completamente ristabiliti e possono sentirsi depressi, con pensiero lento, privi di energia, confusi, ecc.

Sembra probabile che alcuni disturbi dell'omeostasi del neurotrasmettitore rimangano, ma non si sa nulla circa la chimica del cervello di questo fenomeno. Farmaci capaci non solo di trattare il dolore emicranico, ma anche di prevenire la fase dei postdromi sarebbero certamente preferiti (Villalón e Olesen, 2009).

CAPITOLO 2

PEPTIDE CGRP

2.1. Peptide correlato al gene della Calcitonina (CGRP, *Calcitonin Gene-Related Peptide*)

Scoperto nel 1983 nel ratto, il CGRP è un neuropeptide vasoattivo largamente espresso nei neuroni. E' composto da 37 a.a. ed appartiene ad una famiglia di peptidi che comprende calcitonina (CT), adrenomedullina (AM) e amilina (AMY).

Esiste in due isoforme α e β che differiscono l'una dall'altra per un solo amminoacido nel ratto e per tre amminoacidi nell'uomo. I tre amminoacidi per cui le due isoforme si differenziano nell'uomo sono localizzati a livello dei residui 3, 22, 25 (Williams *et al.*, 2009; Moore e Salvatore, 2012). Questi sono, rispettivamente: Asn, Met e Ser nella forma β , Asp, Val e Asn nella forma α (Miranda *et al.*, 2008).

Le isoforme α e β hanno attività biologica molto simile; α -CGRP è quella più abbondante, che si trova in aree discrete del sistema nervoso centrale e periferico ed è maggiormente espressa nei neuroni sensoriali primari in concentrazione da 3 a 6 volte più alta di quella di β -CGRP, come dimostrato da studi immunoistologici (Williams *et al.*, 2009; Villalón e Olesen, 2009). L'isoforma α è prodotta dallo *splicing* di mRNA tessuto specifico alternativo del gene della calcitonina (CT). β -CGRP, che si trova principalmente nei nervi enterici e nell'ipofisi, è codificato da un gene distinto che non produce calcitonina. Quindi le due isoforme sono codificate da geni diversi situati però entrambi sul cromosoma 11 (Smillie e Brain, 2011).

α -CGRP esibisce un ampio range di effetti biologici sui tessuti, il più marcato dei quali è quello della vasodilatazione.

I vasi cerebrali sono densamente innervati dalle terminazioni del nervo trigemino che esprimono CGRP e gli effetti vasoattivi del CGRP sono dimostrati in una varietà di vasi sanguigni, compresi quelli della vascolarizzazione cerebrale.

E' importante il fatto che α -CGRP sia stato riportato come isoforma predominante espressa nei gangli dei neuroni del trigemino e che la dilatazione delle arterie cerebrali abbia dimostrato essere principalmente mediata dall'isoforma α del peptide.

2.2. Struttura del peptide α -CGRP

Tutte le specie di CGRP sono costituite da una singola catena polipeptidica di 37 a.a.

In generale la struttura comprende 4 domini:

- 1) Una porzione N-terminale composta dai primi 7 residui che assumono una struttura simile a quella di un anello tenuto insieme da un ponte disolfuro tra i residui 2 e 7 (Cys2-Cys7);
- 2) un' α -elica "anfipatica" che si trova tra i residui 8-18 (Val-Arg);
- 3) un dominio costituito dai residui 19-27 che consiste in ripiegamenti β o γ ;
- 4) un dominio C-terminale che si trova presso i residui 28-37.

Per la completa attività biologica è richiesto il peptide intatto. Relazioni struttura-attività:

- I residui 1-7 (Ala-Cys) sono richiesti per l'attivazione del recettore; l'anello N-terminale è richiesto per attivare il recettore e quindi la trasduzione del segnale e la rimozione dei primi 7 residui determina la formazione dell'antagonista, CGRP₍₈₋₃₇₎;
- I residui 8-18 (Val-Arg) determinano l'affinità per il recettore e una delezione di questa porzione causa una perdita di affinità di ben 100 volte; in particolare Arg11 e Arg18, localizzati sulla faccia idrofobica dell' α -elica, giocano un ruolo importante nella formazione di un legame ad alta affinità con il recettore;
- Il dominio costituito dai residui 19-27 ha la funzione di regione cerniera e di spaziatore;
- La porzione C-terminale 28-37 è il requisito necessario per far sì che il peptide assuma la giusta conformazione nell'interazione con il recettore. La regione 28-37 contiene due avvolgimenti che possono considerarsi un possibile epitopo per il legame (Villalón e Olesen, 2009; Smillie e Brain, 2011).



Figura 2.1. Peptide CGRP

2.3. Distribuzione e localizzazione del CGRP

CGRP è ampiamente distribuito nel sistema nervoso periferico e centrale come pure nei sistemi cardiovascolare, respiratorio e gastrointestinale.

Neuroni contenenti CGRP innervano tutti gli organi principali e le articolazioni del corpo umano e quindi CGRP modula il funzionamento del sistema immunitario, respiratorio, endocrino, gastrointestinale, muscolo-scheletrico e cardiovascolare.

Nel sistema cardiovascolare, fibre nervose contenenti CGRP sono più abbondanti intorno alle arterie che intorno alle vene nel sistema arterioso, vengono osservate soprattutto nella giunzione della tonaca avventizia e media.

Inoltre, fibre nervose contenenti CGRP sono più abbondanti negli atri che nei ventricoli.

Nella periferia, fibre nervose contenenti CGRP sono associate alla muscolatura liscia quali:

- (I) la maggior parte del tratto gastrointestinale, compresi i dotti escretori della ghiandola parotide, sopra l'epitelio delle ghiandole del fondo dello stomaco di cellule endocrine del duodeno, dell'ileo e di alcuni gangli mienterici,
 - (II) i polmoni,
 - (III) la ghiandola tiroidea (vicino alle cellule C),
 - (IV) la vena splenica e sinusoidi,
 - (V) la pelle umana,
 - (VI) l'ipofisi
- (Villalón e Olesen, 2009).

2.4. Funzioni fisiologiche di CGRP

L'ampia distribuzione del CGRP e dei suoi recettori nel corpo suggerisce che esso svolga un importante ruolo fisiologico.

Ad esempio, nel sistema cardiovascolare CGRP:

- induce effetto cronotropo positivo ed effetto inotropo, nonché un aumento della pressione di perfusione coronarica e del flusso sanguigno;
- media effetti cardioprotettivi.;
- produce vasodilatazione dei vasi sanguigni di capacità e regola il tono vascolare e l'angiogenesi;

Nel sistema nervoso centrale, CGRP:

- modula la percezione del dolore;
- potenzia in generale le azioni eccitatorie che promuovono il rilascio di sostanza P, come pure di aminoacidi eccitatori da fibre afferenti primarie.

Inoltre, a livello periferico, CGRP:

- modula la trasmissione sinaptica su motoneuroni (a livello della giunzione neuromuscolare) a livello locale, inibendo l'espressione della colinesterasi che termina la neurotrasmissione dell'acetilcolina,
- induce degranulazione e successivo rilascio di agenti pro-infiammatori (es.: istamina) dai mastociti durali.

Attività più significative nell'ambito del tema oggetto della tesi, sono la capacità di CGRP di causare vasodilatazione cranica e di facilitare la nocicezione, due fattori importanti nella fisiopatologia dell'emicrania.

Più recenti evidenze supportano un ruolo importante per il CGRP nel regolare l'attività di neuroni e cellule gliali satelliti in gangli del trigemino.

Ad esempio, CGRP rilasciato dai corpi delle cellule neuronali nel ganglio del trigemino può: aumentare la propria sintesi all'interno dei neuroni del trigemino, stimolare il rilascio di NO e varie citochine pro-infiammatorie da cellule gliali satelliti e avere funzioni autocrine e paracrine.

Questi effetti cellulari di CGRP sono mediati attraverso l'attivazione del recettore.

Dal momento che CGRP media eventi cellulari chiave in molti siti all'interno del sistema trigeminovascolare, che si pensa siano coinvolti nella patofisiologia dell'emicrania, antagonisti selettivi del recettore CGRP dovrebbero essere efficaci farmaci antiemicrania (Villalón e Olesen, 2009).

CAPITOLO 3

RECETTORE CGRP

3.1. I recettori accoppiati a proteine G (GPCR)

I recettori accoppiati a proteine G (*G-Protein Coupled Receptors*, GPCR) sono costituiti da una singola catena polipeptidica formata anche da 1100 residui. Strutturalmente presentano 7 α -eliche transmembrana (domini TM-7), un dominio extracellulare N-terminale di lunghezza variabile e un dominio intracellulare C-terminale.

Appartengono a questa famiglia i recettori per le ammine biogene, serotonina compresa, acetilcolina (muscarinici ma non nicotinici) molti ormoni polipeptidici ecc...

Esistono come dimeri o come complessi più grandi.

I GPCR sono divisi in tre distinte famiglie che condividono la stessa struttura a sette eliche ma differiscono per vari aspetti, principalmente per la lunghezza della sequenza N-terminale e la localizzazione del sito di legame per l'agonista.

La famiglia più numerosa è quella della rodopsina (Famiglia A o classe 1).

I membri di questa famiglia possono essere attivati da piccole molecole come ammine, purine, acidi grassi, prostaglandine, come anche da peptidi e grosse glicoproteine.

La famiglia B è costituita dai recettori della secretina, del glucagone e della calcitonina. E' caratterizzata da domini transmembranali simili ma differisce per i tratti N-terminali. E' ricca di bersagli che sono stati clinicamente convalidati attraverso l'uso di peptidi (Congreve *et al.*, 2011) infatti è attivata da peptidi di grandi dimensioni e non da piccole molecole.

L'ultima grande classe è quella del glutammato (famiglia C o classe III).

Questa famiglia è costituita principalmente dai recettori metabotropici del glutammato e dai recettori sensibili al Ca^{++} . Anche questi recettori contengono un esteso segmento N-terminale che forma un dominio di legame con amminoacidi distinto dai domini transmembranalici (Congreve *et al.*, 2011).

La figura 3.1 mostra le tre sottoclassi di recettori evidenziando le posizioni dei siti di legame del ligando naturale (ortosterico). Nella famiglia A questo si trova nella parte superiore del fascio di domini transmembrana.

Nella famiglia B il sito di legame si estende tra la porzione N-terminale e i domini transmembrana, mentre nella famiglia C si trova nella porzione N-terminale, la *Venus fly trap*, così chiamata dal nome inglese della pianta carnivora *Dionea muscipula*, in riferimento al sistema di chiusura delle foglie.

Nelle famiglie A e B il ligando attiva direttamente il recettore legandosi almeno parzialmente all'interno del sito transmembrana, mentre nella famiglia C si ritiene che il legame dell'agonista alla *Venus fly trap* provochi un cambiamento conformazionale che attiva indirettamente il recettore tramite il sito transmembrana. Nelle famiglie B e C il sito transmembrana è quindi considerato allosterico, poiché l'agonista ortosterico interagirebbe principalmente o totalmente con il dominio N-terminale.

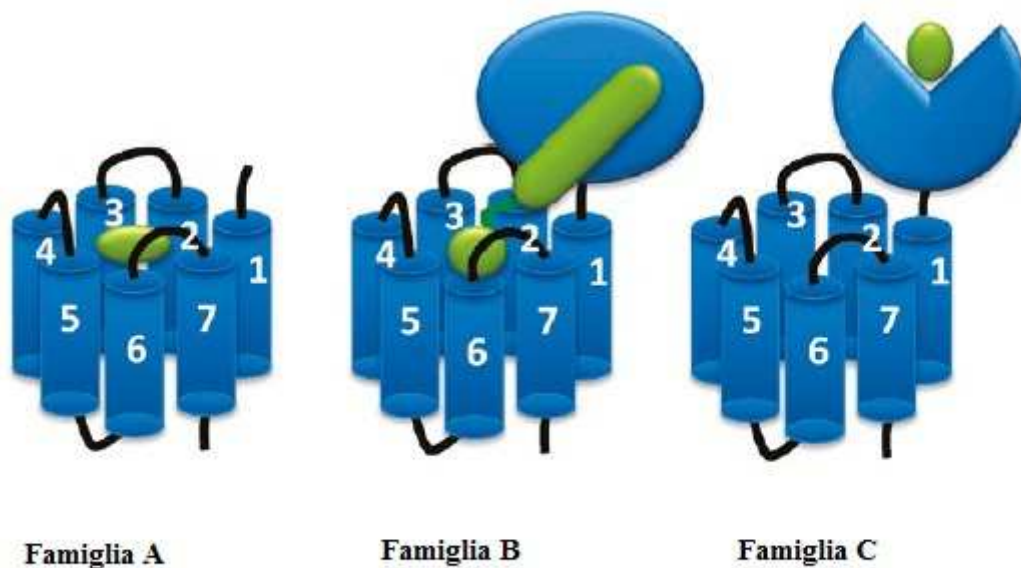


Figura 3.1. Struttura delle tre famiglie di recettori GPCR. Sono evidenziati i 7 domini transmembrana, le porzioni N-terminali e i ligandi naturali in verde (Congreve *et al.*, 2011)

3.2. Il recettore per CGRP

Il recettore per CGRP appartiene ai recettori accoppiati a proteine G sopra descritti ed è costituito da un complesso multimerico che consiste in:

- 1) Recettore a sette domini transmembrana, denominato *Calcitonine Receptor-Like Receptor*, CRL;
- 2) una singola proteina transmembrana, *Receptor Activity Modifying Protein*, RAMP 1;
- 3) un terzo componente, *Receptor Component Protein*, RCP, una proteina accessoria richiesta per particolari funzioni (Moore e Salvatore, 2012).

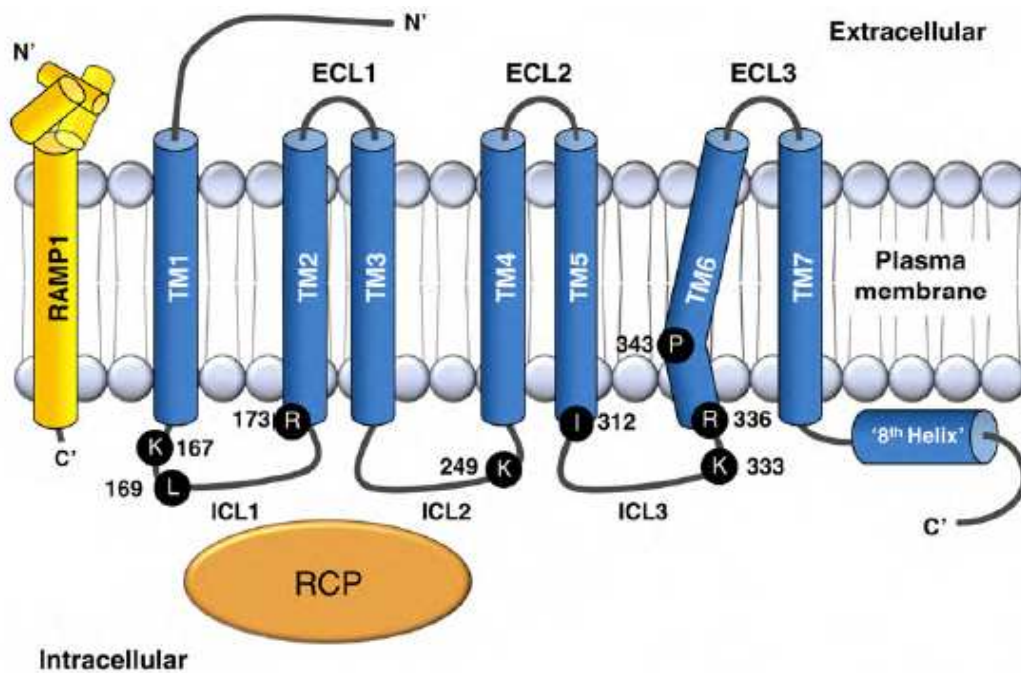


Figura 3.2. Struttura del recettore CGRP; componenti e residui più importanti (Conner *et al.*, 2010) Abbreviazioni: C' , C-terminale; ECL, loop extracellulare; ICL, loop intracellulare ; N', N-terminale; TM, domini transmembrana.

3.2.1. CRL

Appartiene alla famiglia B dei GPCR e comprende l'unità funzionale principale del recettore CGRP (Figura 3.2). Condivide il 55% di omologia con il recettore per la calcitonina. Ci sono solo 2 amminoacidi che differiscono tra CLR umano e quello di topo mostrando così un'omologia dell'89% (topo 463 a.a. e uomo 461 a.a.).

CLR è composto da:

- 7 domini trans membrana (TM1-TM7);
- un dominio N-terminale extracellulare;

- un dominio C-terminale intracellulare, preceduto da un'apparente ottava elica che va da Gly388 a Trp399;
- tre loop extracellulari ECL1, ECL2, ECL3;
- tre loop intracellulari ICL1, ICL2, ICL3.

Una caratteristica molto importante è la presenza di un ripiegamento nel dominio transmembrana TM6 in corrispondenza di Pro343.

Analizziamo nello specifico quali sono le zone più importanti:

Buhlmann *et al.*, (2000) hanno dimostrato che la sostituzione di residui aminoacidici 60 e 112 di un ipotetico sito di glicosilazione extracellulare sul CLR da asparagina a treonina causa una diminuzione dell'espressione superficiale e del legame con il radioligando. Tuttavia, la stessa sostituzione sul sito di glicosilazione 117 non ha influenzato l'espressione cellulare superficiale, ma ha abolito il legame del radioligando con AM e CGRP: ciò indica che questi siti sono vitali per la funzione del recettore. La sostituzione dell'asparagina al sito 117 porta a perdita di funzionalità così che CGRP non è più in grado di riconoscere il complesso CLR/RAMP1.

Un altro elemento essenziale per la funzionalità del recettore CGRP è l'acido aspartico al sito 69; senza di esso CLR è comunque ancora in grado di raggiungere la superficie cellulare.

Importanti sono anche i residui di cisteina nel *loop* intracellulare di CLR umano. La sostituzione di questi residui con alanina nei primi due *loop* causa una diminuzione nella produzione di cAMP, mostrando che queste cisteine formano un ponte disolfuro che è importante per il legame con il ligando e l'attivazione (Kuwasako *et al.*, 2003).

Insieme, questi studi provano che CLR ha importanti aree specifiche che sono richieste per la migrazione del CLR sulla superficie cellulare per formare un recettore funzionale (Smillie e Brain, 2011).

Per quello che riguarda le regioni del recettore importanti per il processo di trasduzione, nelle tre anse intracellulari (ICL1-3) troviamo diverse zone importanti per l'interazione con la proteina G (figura 3.2). Queste zone comprendono residui di Arg173, all'interfaccia tra ICL1 e TM2 e Lys249, su ICL2 ed altri residui idrofobici. Sembra che entrambi abbiano la capacità di interagire direttamente con la proteina G. Un terzo residuo basico di Arg336 in ICL3 sembra anch'esso importante per l'attivazione del recettore e potrebbe essere coinvolto nella stabilizzazione della conformazione attiva. C'è inoltre un interessante potenziale dominio sede di accoppiamento con le proteine G α stimolanti $G_{\alpha s}$ nella regione prossimale di ICL3, che comprende tre residui idrofobici Ile312, Leu316 e Leu320, che eventualmente formano un epitopo come estensione intracellulare di TM5.

Il C-terminale di CLR è stato esaminato in due studi complementari sia come parte del recettore CGRP che del recettore AM1.

Residui Gly388-Trp399 di CLR formano una potenziale ottava elica (figura 3.2) e sono necessari per l'espressione cellulare superficiale. Per la funzionalità del recettore sono importanti la sua espressione sulla superficie cellulare e l'internalizzazione; modifiche del recettore che interessano l'internalizzazione potrebbero giocare un ruolo nella regolazione del segnale semplicemente alterando il tempo di permanenza del recettore sulla superficie cellulare (Kuwasako *et al.*, 2003).

Esaminando una serie di mutanti del C-terminale di CLR, Kuwasako e colleghi hanno rilevato una regione corrispondente alla putativa ottava elica che è importante per l'accoppiamento con $G_{\alpha s}$.

Sebbene la comprensione sui meccanismi molecolari che regolano l'attivazione del recettore CGRP siano ancora limitati, è possibile suggerire un modello generale di attivazione, basato soprattutto sul modello denominato “*flowering*” della super-famiglia GPCR nel suo complesso.

L'attivazione del recettore provoca un movimento delle regioni TM, modificando la superficie intracellulare del recettore e i suoi contatti con le proteine G. Ulteriore lavoro è necessario per descrivere i contatti specifici (Walker *et al.*, 2010).

3.2.2. RAMP1

La famiglia delle RAMP umane consiste di tre proteine, costituite da 148-175 amminoacidi, chiamate RAMP1, RAMP2, RAMP3 che presentano una struttura comune costituita da:

- Un dominio trans membrana composto di una sola α elica di 22 a.a;
- un grosso dominio N-terminale extracellulare costituito da 90 residui per RAMP1/3 e circa 103 per RAMP2, che sembra sia coinvolto nella determinazione del fenotipo;
- una sequenza segnale che va da 26 o 27 residui per RAMP1/3 e 42 a.a. per RAMP2 prevista all'estremità N-terminale;
- una regione costituita da 3 eliche $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$; anche questi nell'N-terminale;
- un corto dominio C-terminale intracellulare di 9 a.a.

Mentre la porzione N-terminale è determinante per la farmacologia del recettore, le porzioni TM e C-terminale sembrano essere importanti nell'interazione con il recettore CLR (Qi e Hay 2010).

In relazione al recettore CGRP è interessante approfondire la struttura di RAMP1. Infatti la co-espressione di RAMP1 con CLR forma un eterodimero che determina il recettore per CGRP.

L'N-terminale della proteina RAMP sembra essere la regione più importante per la funzionalità del recettore, come appare da una estesa letteratura che indica i ruoli individuali dei residui e delle singole regioni, determinati attraverso l'uso di sostituzione e delezione degli amminoacidi. Distinte regioni all'interno delle α -eliche 2 e 3 della regione N-terminale inducono cambiamenti nell'espressione del recettore CGRP (Simms *et al.*, 2009). Altri studi hanno mostrato l'importanza della porzione C-terminale di RAMP1. L'interruzione dei 5 amminoacidi vicino al dominio trans membrana alla posizione 140-145 causa una diminuzione alla funzionalità del recettore, implicando che CLR e RAMP1 non possano più dimerizzare tra loro.

Delezioni dei residui amminoacidici alle posizioni 91-94, 96-100 e 101-103 portano a una totale inibizione dell'accumulo di cAMP (Kuwasako *et al.*, 2003). All'interno del dominio extracellulare di RAMP si trovano sei residui di cisteina. Studi di cellule COS-7 guardano agli effetti che la delezione dei residui ha sulla funzionalità della RAMP1.

La delezione del residuo Cys27 o la sostituzione con alanina del residuo 82 non ha effetto sulla funzionalità o formazione del recettore CGRP.

Tuttavia la sostituzione dell'alanina sui residui 40, 57, 72 e 104 causa una perdita della formazione del recettore CGRP. Questo dimostra l'importanza di questi residui per la formazione di un recettore funzionale sulla superficie cellulare (Smillie e Brain, 2011).

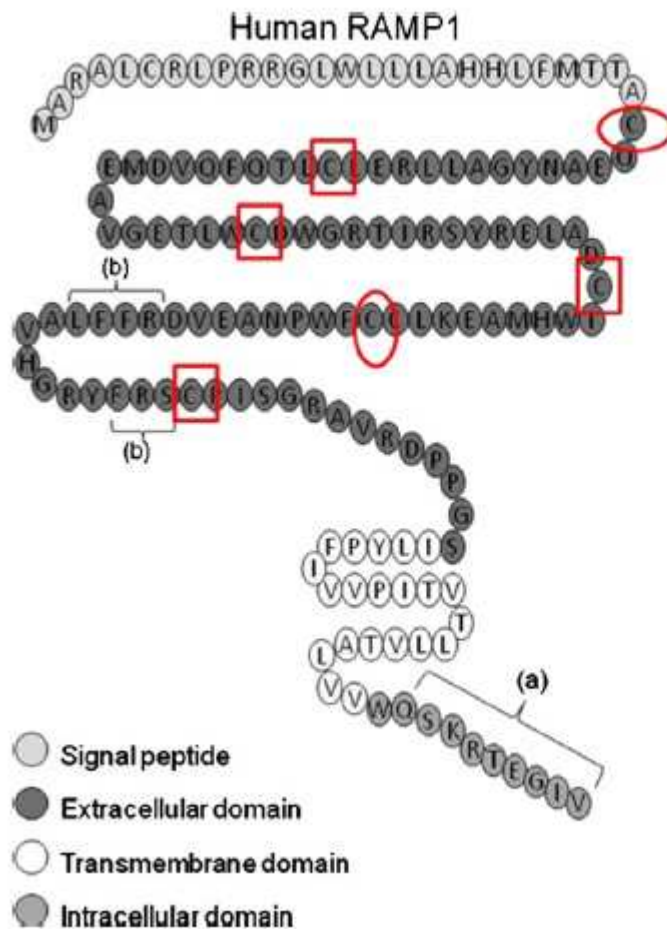


Figura 3.3. Sequenza amminoacidica della RAMP1 umana. I cerchi in rosso indicano le aree dove la delezione/sostituzione con alanina non ha effetto sulla funzionalità del recettore CGRP. I quadrati rossi indicano dove la sostituzione con alanina porta ad una perdita di funzionalità del recettore. (a) Indica i residui che, se tolti, provocano una perdita della funzionalità del recettore. (b) Illustra i residui che, se eliminati, portano ad una inibizione dell'accumulo di cAMP (Smillie e Brain, 2011)

Come già accennato, la porzione N-terminale di RAMP1 umana è costituita da tre α -eliche (residui 27-107) la cui organizzazione è stabilizzata da tre legami disolfuro, come confermato da una struttura cristallina (Kusano *et al.*, 2008) (Figura 3.4). L' α -elica 1 è formata dai residui da Glu29 a Val51 e si ripiega in corrispondenza del residuo Leu39.

Essa è seguita da una piccola elica, la cui struttura consiste degli a.a. da Glu53 a Leu55, che si trova dentro il *loop* che connette le α -eliche 1 e 2.

L' α -elica 2, che inizia con Trp59 e finisce con Leu80, è antiparallela rispetto alle altre due eliche, mentre l' α elica 3 è formata dai residui che vanno da Ala87 a Tyr100. I residui interagenti formano tre legami disolfuro. La struttura è mantenuta da siti di interazione idrofobici multipli, che sono per lo più localizzati tra le α -eliche 1 e 2.

Sulla porzione N-terminale di RAMP1 è stata poi identificata una zona idrofobica localizzata sulle eliche 2 e 3 (Kusano *et al.*,2008). È stato proposto che i residui che costituiscono l'interfaccia di legame tra il recettore CLR e il peptide (CGRP) si trovino in questa area.

Sembra che Phe93, His97 e Phe101 formino l'interfaccia di legame del CLR e sembrano conservati in tutte le RAMP, dimostrando quindi un ruolo importante nella funzionalità di queste proteine, mentre i residui Arg67, Asp71, Trp74 e 78 e 84 costituiscono la tasca di legame per CGRP.(Qi e Hay, 2010).

Questo argomento è stato ampiamente recensito da Qi e Hay (2010), che descrivono la struttura di tutte le porzioni di RAMP1 molto dettagliatamente.

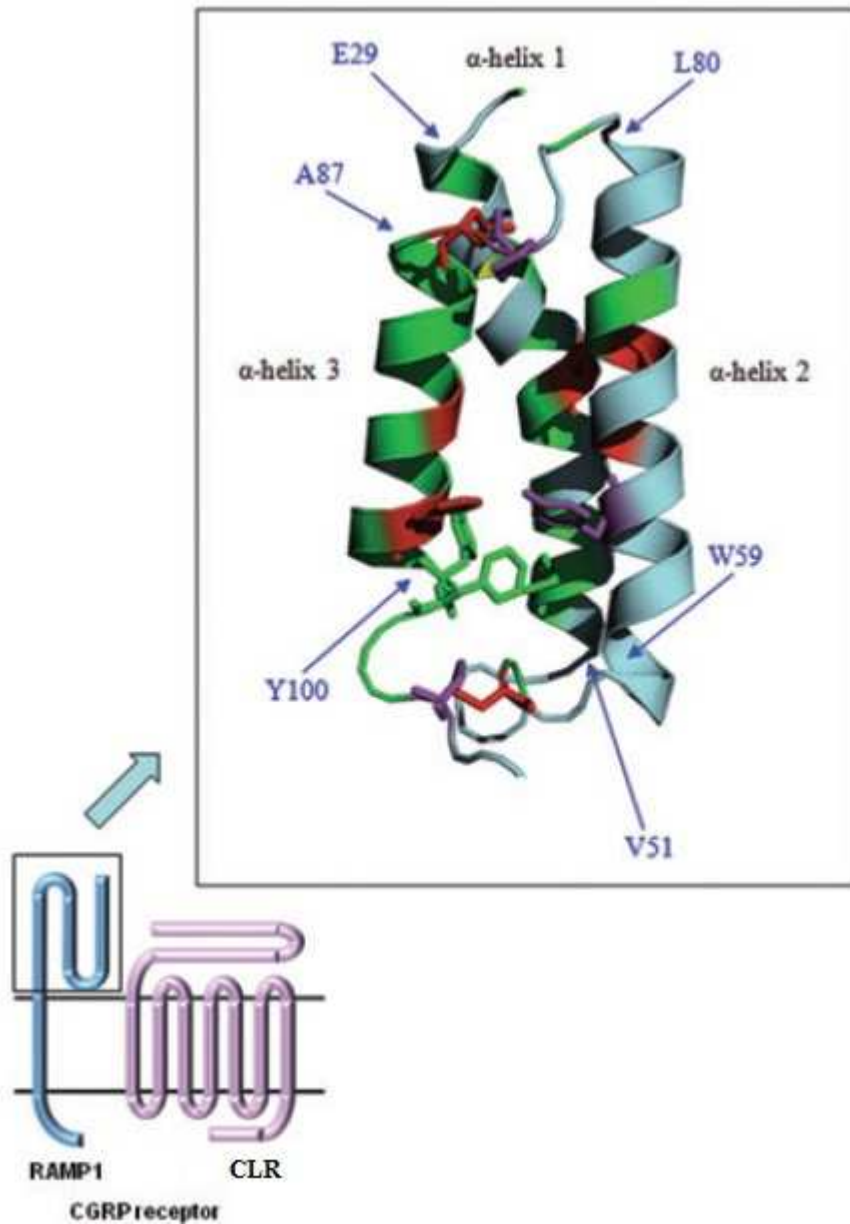


Figura 3.4. (A) Rappresentazione schematica del recettore CGRP. La porzione ingrandita mostra la struttura della porzione N-terminale della RAMP umana. La figura è tratta da Qi e Hay (2010) (I) E =Glu29 V =Val51 (II) W=Trp59 L=Leu80 (III) A=Ala87 Y=Tyr100

I peptidi RAMP sono localizzati nel reticolo endoplasmatico e sono richiesti per:

- 1) facilitare la traslocazione intracellulare della proteina CLR;
- 2) promuovere l'espressione del CLR sulla superficie cellulare e con ciò determinare la relativa affinità di questo recettore per CGRP;
- 3) modulare la farmacologia del CLR fornendo un meccanismo per cui una cellula possa cambiare la sua sensibilità da un recettore all'altro.

Almeno una proteina RAMP è espressa in tutti i tessuti: cuore, utero, cervello, vescica, muscoli scheletrici, pancreas e sistema gastrointestinale. Tutte e tre le RAMP sono inoltre espresse nel tessuto adiposo, ma la loro funzione in questa sede è sconosciuta.

3.2.3. Interazione CLR e RAMP1

Studi genetici hanno evidenziato che la coespressione di questi due componenti è obbligatoria per la completa funzionalità del recettore CGRP, poiché nessuno di essi induce una risposta significativa di CGRP quando transfettato da solo (Qi e Hay, 2010).

Kusano e colleghi hanno costruito un modello di RAMP1 umana che comprendeva gli 81 residui da CYS27 a Ser107. Il modello confermava la struttura a tre eliche suggerita da Simms e coautori e rivelava una zona idrofobica vicino a Trp74 (Kusano *et al.*, 2008). Sulla base di questa struttura e dei dati di mutagenesi precedenti, è evidente che il Trp74 in RAMP1 è parte di una piccola tasca di legame per il ligando sulla superficie esposta al solvente del complesso CLR/RAMP1 (Mallee *et al.*, 2002; Kusano *et al.*, 2008). I residui Arg67, Asp71, Trp74 e Glu78 fanno tutti parte dell'elica $\alpha 2$, mentre il residuo Trp84 si trova sull'anello tra le eliche $\alpha 2$ e $\alpha 3$ con la sua catena laterale orientata nella stessa direzione di Trp74 (Kusano *et al.*, 2008).

Questo modello della porzione extracellulare del RAMP1 dà informazioni preziose sulla natura di questa componente del recettore, ma non su come è strutturato l'intero complesso costituito da CLR e RAMP1.

Per capire meglio come fosse strutturato l'intero complesso CLR/RAMP1, Koth e colleghi (Koth *et al.*, 2010) hanno creato un costrutto che comprendeva sia la porzione extracellulare di CLR umano (residui 23-133) sia quella di RAMP1 umana (residui 26-117) e videro che queste regioni di CLR e RAMP1 erano in grado di formare un complesso stabile costituendo un dominio extracellulare (ECD).

Il complesso ECD è stato in grado di competere con il recettore CGRP nativo su cellule SK-N-MC per il legame del peptide marcato [¹²⁵I] CGRP (Koth *et al.*, 2010). L'ECD mostra minore affinità per il CGRP (IC₅₀ = 12 μm), ma è stato dimostrato che esso lega gli antagonisti Olcegepant e Telcagepant con alta affinità (Koth *et al.*, 2010).

Il modello di interazione con gli antagonisti sarà discusso più dettagliatamente in seguito (cap. 6).

Una volta sulla superficie, RAMP è in grado di regolare la farmacologia del recettore attraverso la modulazione allosterica dell'interazione con il ligando su CLR, oppure definendo a livello della superficie cellulare una tasca di legame per l'interazione CLR-RAMP.

Esperimenti di *cross-linking* con ligandi radiomarcanti tra CGRP e proteine equivalenti in peso a RAMP1 da sola, CLR da solo e RAMP1/CLR hanno mostrato che il ligando instaura contatti con entrambi i componenti del recettore (Moore e Salvatore, 2012).

3.2.4. RCP

Il terzo componente del recettore per CGRP, RCP (proteina componente il recettore) è una proteina accessoria richiesta per una corretta funzionalità biologica in quanto coinvolta nell'accoppiamento del recettore con cascate metaboliche quali la via delle protein chinasi.

L'espressione di RCP è tipicamente correlata con la risposta a CGRP in molti tessuti. La soppressione dell'espressione di RCP riduce la produzione di cAMP mediata da CGRP, senza influire sul suo legame al recettore.

Così, RCP è probabilmente essenziale per l'accoppiamento con $G_{\alpha s}$ e potrebbe giocare un ruolo unico nella trasduzione del segnale per mezzo di CLR. Ulteriori indagini sono richieste per verificare se però RCP aiuti da solo il recettore CGRP a legarsi a $G_{\alpha s}$.

RCP aggiunge complessità al controllo dell'attività di CGRP e la sua relativa espressione potrebbe avere importanti implicazioni in altre malattie in cui è coinvolto CGRP (Walker *et al.*, 2010).

3.3. Meccanismo con cui CGRP si lega al proprio recettore

Si pensa che il meccanismo con cui CGRP si lega al recettore possa essere interpretato secondo il modello generale dei due domini indicato da Hoare (2005).

In questo modello, il C-terminale del ligando peptidico prima si lega con alta affinità alla porzione extracellulare N-terminale del recettore formando una cosiddetta trappola di affinità (Hoare, 2005). Per il recettore CGRP, il peptide agonista interagirebbe prima con le regioni N-terminali di entrambe le proteine, CLR e RAMP1. Questo evento iniziale di legame ad alta affinità aumenta notevolmente la concentrazione del peptide in loco che consente a questo punto interazioni a minore affinità del N-terminale del peptide con la regione

juxtamembrana del recettore, per procedere infine all'attivazione del recettore (Hoare, 2005). Questo fenomeno è ben dimostrato dal fatto che il peptide CGRP₈₋₃₇ in cui mancano i primi sette aminoacidi è in grado di legarsi al recettore, ma non di attivare la produzione di cAMP; infatti, come abbiamo già affermato, si comporta come un antagonista funzionale. L'applicazione del modello dei due domini al recettore CGRP è illustrata nella Figura 3.5(a) e 3.5(b) (Moore e Salvatore 2011).

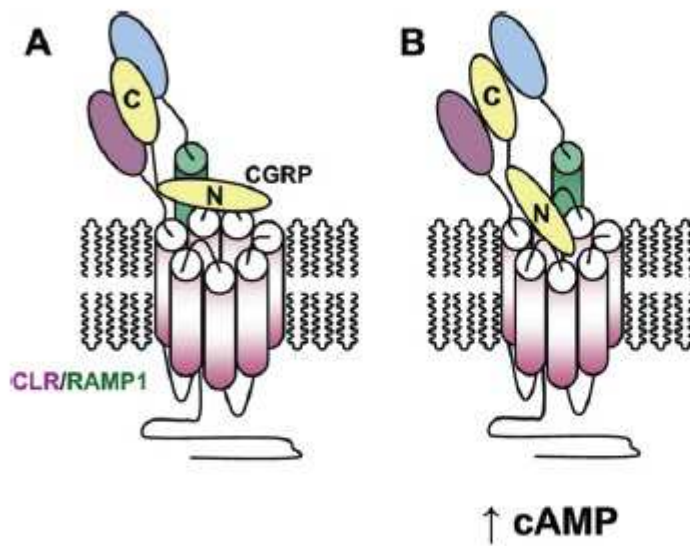


Figura 3.5. Modello di legame dei due domini applicato al recettore CGRP (Moore e Salvatore, 2012)

CAPITOLO 4

TRASDUZIONE DEL SEGNALE

4.1. Trasduzione del segnale da parte dei GPCR

Attraverso l'attivazione di vari meccanismi di trasduzione del segnale, i recettori accoppiati a proteine G (*G-Protein Coupled Receptors*, GPCR) controllano diversi aspetti della funzione cellulare. Il collegamento tra il recettore e il primo stadio della trasduzione del segnale viene stabilito attraverso le proteine G che rappresentano così il livello intermedio nella gerarchia organizzativa di gestione della comunicazione tra recettori ed enzimi effettori o canali ionici (Katzung, 2009).

Le proteine G sono dei complessi eterotrimerici, costituiti cioè da 3 subunità proteiche. Esistono diverse classi di proteine G

Proteine	Recettori per:	Effettori/Vie di trasduzione
G_s	Ammine β -adrenergiche, glucagone, istamina, serotonina e molti altri ormoni	\uparrow Adenilciclasa $\rightarrow \uparrow$ cAMP
$G_{i1}; G_{i2}; G_{i3}$	Ammine α_2 -adrenergiche, acetilcolina (muscarinico) oppioidi, serotonina e molti altri ormoni.	\downarrow Adenilciclasa $\rightarrow \downarrow$ cAMP Apertura dei canali al K^+
G_o	Neurotrasmettitori cerebrali (non ancora identificati in modo specifico)	Non ancora chiariti
G_q	Acetilcolina (muscarinico), serotonina ($5-HT_{1c}$) e molti altri	\uparrow fosfolipasi C $\rightarrow \uparrow$ IP ₃ , diacilglicerolo, Ca^{2+} citoplasmatico
$G_{t1}; G_{t2}$	Fotoni (rodopsina)	\uparrow cGMP fosfodiesterasi $\rightarrow \downarrow$ cGMP (foto trasduzione)
G_{olf}	Odoranti (epitelio olfattorio)	\uparrow adenilciclasa $\rightarrow \uparrow$ cAMP

Figura 4.1. Proteine G ,effettori e vie di trasduzione (Katzung, 2009)

Queste 6 classi possono essere ulteriormente suddivise se si prendono in considerazione le subunità che le compongono (Hildebrandt, 1997).

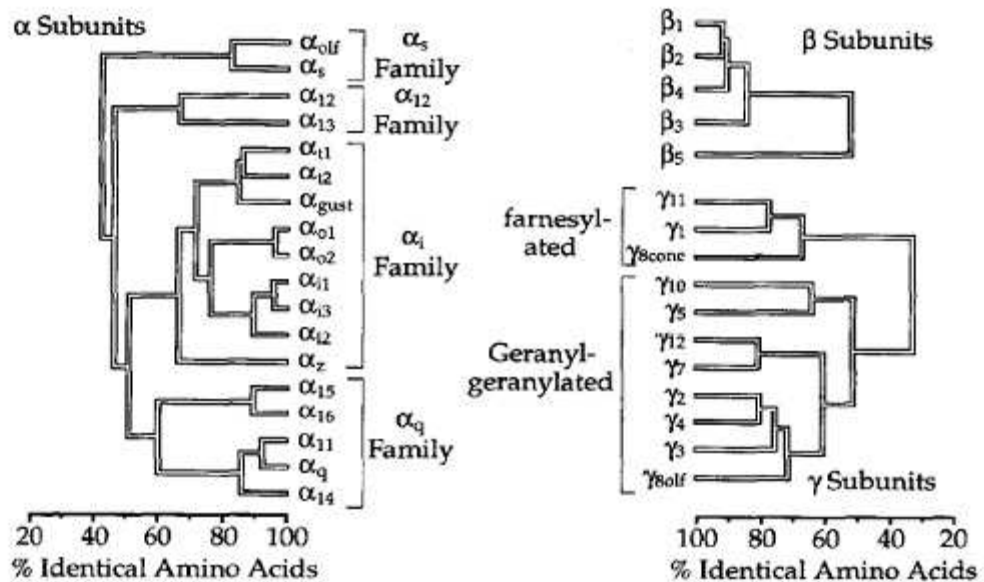


Figura 4.2. Isoforme subunità proteine G (Hildebrandt, 1997)

Il meccanismo di trasduzione inizia quando ligandi extracellulari aumentano la concentrazione di secondi messaggeri come ad esempio cAMP e altri.

Si viene a creare un sistema di trasmissione transmembrana costituito nella maggior parte dei casi da tre componenti.

In primo luogo, il ligando extracellulare è riconosciuto da un recettore di membrana.

Il recettore attiva a sua volta una proteina G localizzata sul lato citoplasmatico della membrana. La proteina attivata modifica l'attività di un effettore, di solito un enzima o un canale ionico.

Mediante l'attivazione dall'adenilato ciclastasi viene a crearsi un aumento del cAMP e quindi attivazione delle proteine chinasi A o cAMP dipendenti (figura 4.3(a)). Come molti recettori accoppiati a proteine G, il recettore CGRP è in grado di accoppiarsi anche con altri tipi di proteine e non solo quelle stimolatorie (G_{as}).

Come si può vedere dalla figura, questo tipo di recettore può legarsi:

(b) Alle proteine di tipo $G_{\alpha_{i/o}}$ determinando l'inattivazione dell'adenilato ciclastasi che porta quindi ad una diminuzione del cAMP e in questo modo ad una riduzione dell'attività delle PKA.

(c) Alle proteine $G_{\alpha_{q/11}}$: ciò porta ad un'attivazione della fosfolipasi che trasforma PIP_2 (fosfatidilinositolo-4,5-difosfato) in PIP_3 e diacilglicerolo (DAG) determinando così un aumento del Ca^{2+} intracellulare.

(d) I recettori CGRP possono inoltre utilizzare una trasduzione del segnale indipendente dalle $G\alpha$ e cascate per la trasmissione del segnale mediate da proteine $G_{\beta\gamma}$ e β -arrestine (Walker *et al.*, 2010).

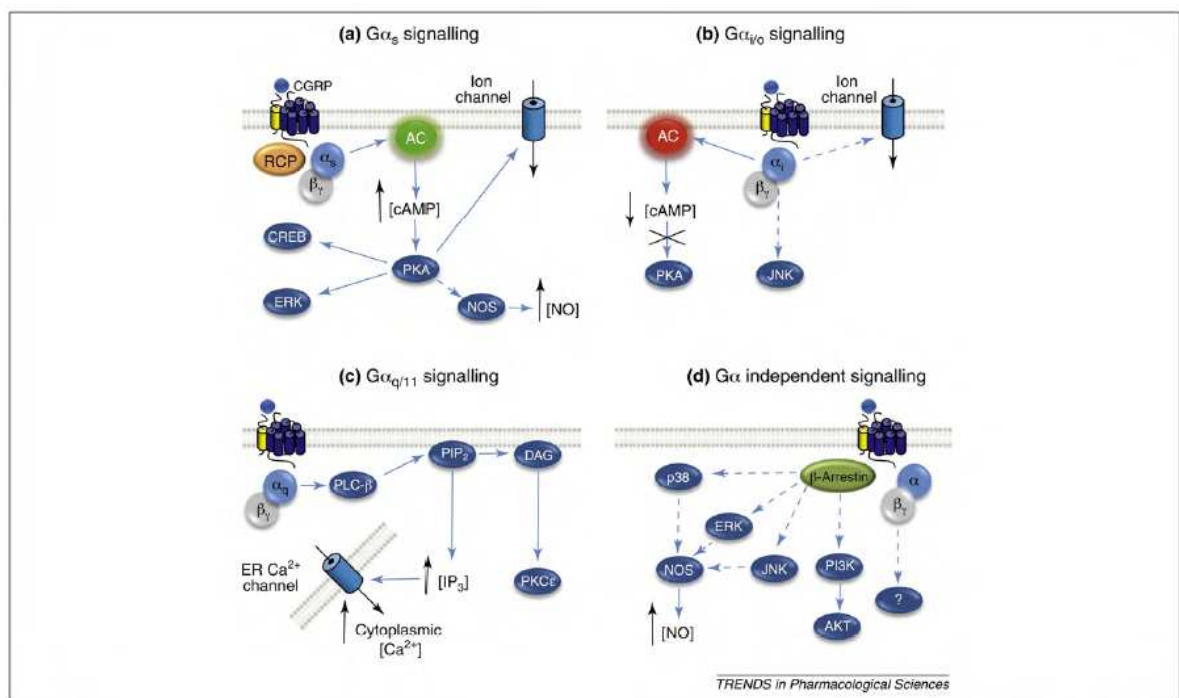


Figura 4.4. Trasduzione del segnale mediata dai recettori CGRP (Walker *et al.*, 2010)

In generale l'attivazione dei recettori CGRP aumenta i livelli di cAMP e cGMP in numerose cellule del nostro organismo e questi sono i secondi messaggeri associati alla vasodilatazione.

Per quanto riguarda il meccanismo di trasduzione del segnale vascolare (che è quello di interesse relativamente ai farmaci antiemicrania) il CGRP, quando si lega al suo recettore, induce una vasodilatazione attraverso un meccanismo endotelio-dipendente e uno endotelio-indipendente (Villalón e Olesen, 2009).

Percorso endotelio dipendente

In vasi come aorta toracica, arterie polmonari e renali dei ratti o nelle arterie brachiali umane, CGRP quando si lega al suo recettore attiva l'adenilato ciclasi nell'endotelio e in tal modo aumenta i livelli di AMP ciclico (cAMP).

Questo, di conseguenza, attiva l'enzima NO sintetasi (NOS) che a sua volta aumenta i livelli di ossido d'azoto NO.

NO agisce sulle cellule muscolari lisce attivando guanililciclastasi, con conseguente produzione di GMP ciclico (cGMP) che porta a rilassamento vascolare. (Villalón e Olesen, 2009).

Percorso endotelio indipendente

Nelle arterie craniche di ratto e di uomo CGRP "by-passa" l'endotelio e si lega direttamente ai recettori per CGRP sia per diffusione nelle arterie senza barriera ematoencefalica che per rilascio diretto dalle terminazioni nervose sul lato abluminale dell'arteria: in questo modo, si lega direttamente ai recettori per CGRP sulle cellule muscolari lisce attivando adenilato ciclasi, che a sua volta aumenta i livelli di cAMP che porta a rilassamento vascolare.

E' interessante notare che alcuni vasi, come le arterie basilari e le mesenteriche superiori di ratto, mostrano sia il percorso endotelio dipendente che indipendente.

L'aumento di cAMP indotto da CGRP attiva proteine chinasi A che si fosforilano e quindi aprono i canali del potassio K_{ATP} nella muscolatura liscia delle arterie di coniglio.

E' stato osservato che nelle arterie durali di ratto l'effetto del CGRP è significativamente inibito dall'inibitore dei canali K_{ATP} , glibenclamide. Evidentemente, le risposte di vasodilatazione indotte da CGRP coinvolgono altri secondi messaggeri, compresi cAMP, NO, cGMP, canali del K^+ .

Inoltre, in colture cellulari di gangli del trigemino, l'attivazione dei recettori per CGRP aumenta i livelli di cAMP, che a loro volta vanno ad aumentare l'attività promotrice di CGRP e i livelli di CGRP mRNA.

Questi risultati indicano un'auto-attivazione dell'espressione di CGRP e il fatto che un elevato rilascio di CGRP nel sistema trigemino possa creare un ciclo a *feedback* autosufficiente (Villalón e Olesen, 2009).

CAPITOLO 5

CGRP E EMICRANIA

5.1. Il peptide correlato al gene della calcitonina e l'emicrania

Dalla scoperta e identificazione di CGRP (Rosenfeld *et al.*, 1983), il suo coinvolgimento in casi di emicrania è stato gradualmente chiarito e questo ha portato allo sviluppo del primo antagonista del recettore CGRP efficace come farmaco antiemicranico. Una breve panoramica di questa ricerca è di seguito illustrata.

Quasi immediatamente dopo la scoperta del CGRP, Uddman *et al.*, (1985) hanno studiato la sua presenza nei vasi sanguigni cranici e hanno scoperto che è localizzato nei nervi trigeminali perivascolari. Inoltre, McCulloch *et al.*, (1986) hanno dimostrato la presenza di un riflesso cerebrovascolare protettivo che utilizza CGRP come trasmettitore.

Successivamente, Goadsby *et al.* (1990) hanno dimostrato che durante un attacco di emicrania la concentrazione plasmatica di CGRP, ma non di altri neuropeptidi, è elevata nel sangue venoso della giugulare esterna (cioè il sangue drenato dai tessuti extracerebrali, compresa la dura madre). Insieme con le scoperte scientifiche di base, questo risultato ha suscitato interesse per CGRP nel settore farmaceutico sebbene, successivamente, sia stato difficile riprodurre l'aumento di CGRP riscontrato da Goadsby.

L'azienda farmaceutica Boehringer Ingelheim ha sviluppato un antagonista non-peptidico del recettore CGRP, BIBN4096BS, in seguito chiamato Olcegepant, che è stato considerato potenzialmente efficace nel trattamento dell'emicrania per le ragioni sopra esposte.

Un notevole supporto alla decisione di inoltrare questo composto ad uno sviluppo clinico è stata la constatazione che l'infusione di CGRP in pazienti affetti da emicrania causa un mal di testa con sintomi simili a quelli degli attacchi spontanei. Infine, la prova del principio dell'antagonismo verso CGRP per trattamenti acuti di emicrania è emersa in una sperimentazione clinica di fase II di Olcegepant: questo composto poteva però essere somministrato solo per via endovenosa; in seguito, i laboratori Merck Research hanno sviluppato un agente biodisponibile per via orale, Telcagepant, sotto forma di compresse (Villalón e Olesen, 2009).

5.2. Il peptide correlato al gene della calcitonina e il suo ruolo nella fisiopatologia dell'emicrania

Nelle sezioni precedenti abbiamo sottolineato la localizzazione generale del CGRP e dei suoi recettori nel corpo. Questa sezione farà particolare riferimento alle fonti di CGRP cerebrovascolare, ai siti specifici di azione e ai meccanismi di CGRP che possono essere rilevanti durante l'emicrania (Villalón e Olesen, 2009).

5.2.1. Fonti cerebrovascolari del peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP)

Sei principali fonti di CGRP cerebrovascolare sono particolarmente rilevanti nell'emicrania: il nucleo spinale e il ganglio del trigemino, i rami mascellari e oftalmici che raggiungono i terminali nervosi perivascolari, i minigangli interni carotidei, le radici cervicali 1-3 e l'innervazione parasimpatica dei vasi sanguigni cranici (Villalón e Olesen, 2009).

5.2.2. Localizzazione dei recettori per CGRP rilevanti per l'emicrania

Ci sono almeno quattro siti di azione di CGRP che possono essere coinvolti nell'emicrania, vale a dire:

(I) Vasi sanguigni cerebrali e extracerebrali, in cui l'attivazione dei recettori CGRP produce una risposta vasodilatatoria che può essere bloccata da Olcegepant;

(II) Mastociti durali, da cui l'attivazione dei recettori CGRP porta al rilascio di citochine e agenti infiammatori durante l'infiammazione neurogena;

“Infiammazione neurogena” è il termine comunemente usato per descrivere una serie di risposte infiammatorie determinate dal rilascio di neuropeptidi, che comprendono anche calcitonina, CGRP e altre sostanze come sostanza P e neurochinina A, dai terminali dei nervi sensoriali primari in risposta a un danno. Questi neuroni sensoriali sono abbondanti in quasi tutti i tessuti a livello perivascolare e sono noti anche come nocicettori polimodali per la loro capacità di essere attivati da stimoli chimici, termici, meccanici (Smillie e Brain, 2011).

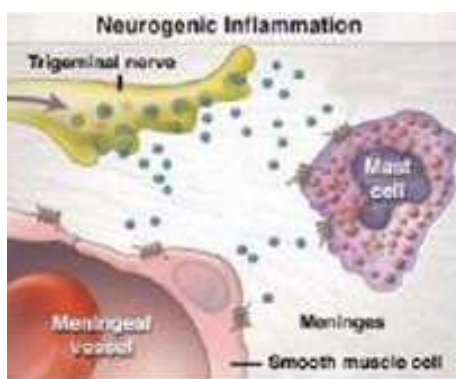


Figura 5.1. Infiammazione Neurogena (Gupta e Villalón., 2010)

(III) Neuroni di secondo ordine dei nuclei del trigemino nel tronco encefalico sul quale recettori per CGRP post-sinaptici possono anche essere bloccati da Olcegepant;

(IV) Ganglio trigeminale, dove CGRP aumenta la propria sintesi e stimola il rilascio di NO e diverse citochine proinfiammatorie.

Coerentemente con i risultati sopra riportati, le proteine CLR e RAMP1 (le quali costituiscono Recettori funzionali per CGRP) hanno dimostrato essere altamente espresse in diversi tessuti o cellule, tra cui:

(I) Vascolarizzazione cerebrale umana;

(II) Dura madre (cranica) e mastociti durali, ganglio trigeminale e terminazioni nervose presinaptiche nel nucleo spinale del trigemino;

(III) Neuroni e glia nel sistema nervoso centrale e periferico, come neuroni di II ordine e astrociti;

(IV) Cellule di Schwann e cellule gliali del ganglio del trigemino.

Inoltre i livelli di RAMP1 sono potenzialmente limitanti per le azioni di CGRP nei gangli del trigemino: di conseguenza, livelli elevati di RAMP1 nei neuroni potrebbero potenzialmente sensibilizzare i gangli del trigemino di individui alle azioni di CGRP. Queste azioni comprenderebbero l'aumento della sintesi di CGRP e una maggiore infiammazione neurogena, che potrebbe contribuire a sostenere e intensificare l'attività nocicettiva di CGRP nell'emicrania (Villalón e Olesen, 2009).

5.2.3. Ruolo funzionale del CGRP cranico e i suoi recettori

Come discusso nelle sezioni precedenti, la somministrazione endovenosa di CGRP provoca un attacco di mal di testa simile a emicrania.

CGRP dilata potentemente le arterie cerebrali ed extracerebrali ma non le vene, in accordo con l'assenza di recettori CGRP sulle vene cerebrali. Dopo stimolazione elettrica, le terminazioni nervose rilasciano CGRP e questo dilata le arterie e arteriole.

Tuttavia, in contrasto con questi stimoli non fisiologici, non è mai stata registrata attività spontanea efferente nei nervi sensoriali di nessuna parte del corpo.

Pertanto, resta ancora sconosciuto un qualsiasi stimolo fisiologico o fisiopatologico che provochi il rilascio di CGRP dalle terminazioni nervose.

L'attività efferente nei nervi parasimpatici e il rilascio di NO o altri neurotrasmettitori potrebbero forse avere questo effetto. Certamente, l'attivazione di alcuni canali ionici come il recettore vanilloide di tipo 1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid*, TRPV1) può farlo, ma non è noto se questo accada in vivo.

Negli studi di applicazioni di CGRP nella dura madre di ratto non è stato osservato nessun effetto sensibilizzante sui neuroni con un input durale.

Inoltre, CGRP non ha causato alcun dolore da solo o in combinazione con bradichinina in un modello di pelle umana e i recettori per CGRP non erano presenti nelle terminazioni nervose periferiche del trigemino. Questi studi indicano che è improbabile che CGRP abbia un ruolo periferico nella cefalea, come nella nocicezione in generale. Inoltre, l'antagonista del recettore per CGRP Olcegepant può inibire i neuroni centrali trigemino cervicali in vivo nel gatto. Tuttavia, resta ancora da spiegare come l'infusione di CGRP possa causare un attacco di emicrania, come discusso in precedenza.

CGRP è presente nel plasma umano normale, ma il suo ruolo è sconosciuto.

Esso potrebbe provocare un costante effetto dilatatorio sulle arterie umane, così come potrebbe forse avere un effetto tonico che potrebbe diffondersi alle terminazioni dei nervi periarteriali.

Se così fosse, il blocco dei recettori per CGRP potrebbe comportare un rischio di vasocostrizione o vasospasmo.

Tuttavia, esperimenti con dosi elevate di Olcegepant hanno mostrato che non c'è stato assolutamente alcun effetto di questo antagonista sulla pressione arteriosa, sulla frequenza cardiaca o flusso sanguigno cerebrale in soggetti volontari sani (Figura.5.2.).

Questo risultato ha fortemente suggerito che gli antagonisti del recettore per CGRP sarebbero stati sicuri da un punto di vista cardiovascolare (Villalón e Olesen, 2009).

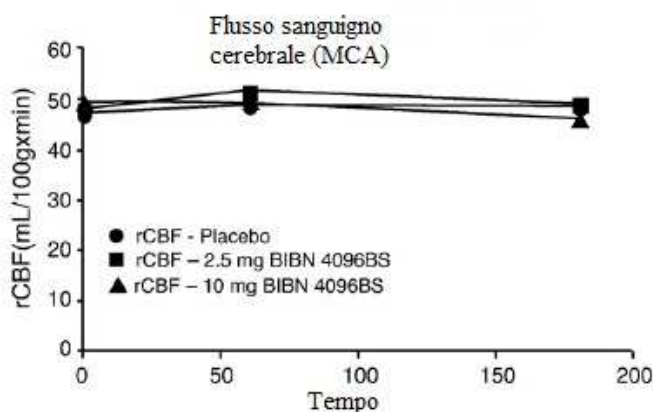


Figura 5.2. Olcegepant (BIBN4096BS) non ha effetti sul flusso sanguigno cerebrale (rCBF) nella zona dell'arteria cerebrale media (MCA) (Villalón e Olesen, 2009)

5.2.4. CGRP e ossido nitrico

NO è una molecola segnale importante coinvolta:

- (I) Nello sviluppo e nel mantenimento dell'infiammazione e del dolore;
- (II) nella sintesi e nel rilascio di CGRP dai neuroni dei gangli del trigemino;

(III) nella fisiopatologia dell'emicrania. Infatti, sia NO che CGRP possono causare un mal di testa immediato o un attacco ritardato simile ad emicrania in chi ne soffre con caratteristiche quasi identiche.

Inoltre, gli inibitori della produzione di NO (Lassen *et al.*, 1997; Olesen, 2008) e gli antagonisti del recettore per CGRP (Olesen *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2008; 2009) sono efficaci nel trattamento di attacchi di emicrania spontanei.

Quindi ci potrebbe essere una sorta di percorso finale comune tra le azioni di queste due molecole nell'emicrania.

Questa interazione è stata precedentemente discussa ma nuovi dati importanti sono ora disponibili. Una lenta infusione per via endovenosa del donatore di NO sodio nitroprussiato (SNP) ha causato un ritardo di attività neuronale nel nucleo trigeminale spinale del ratto, e questo potrebbe essere contrastato con infusione di Olcegepant (Figura 5.3).

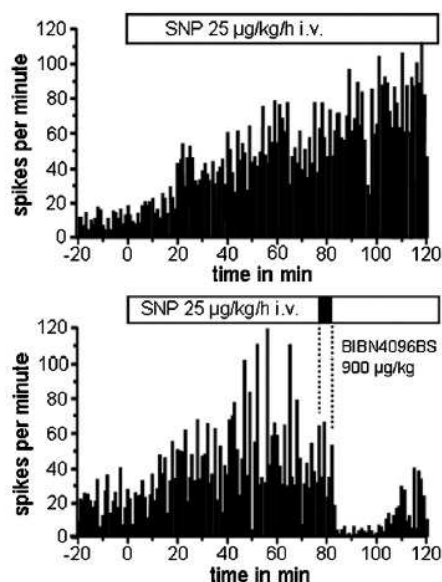


Figura 5.3. Olcegepant (BIBN4096BS) è in grado di bloccare l'attivazione di neuroni il cui input durale è indotto da donatori di NO, sodio nitroprussiato (SNP) (Villalón e Olesen, 2009)

Questi e molti altri studi su animali indicano che NO potrebbe causare emicrania attraverso il rilascio di CGRP dai siti centrali. Tuttavia, un recente studio sull'uomo mostra che il pretrattamento con alte dosi di Olcegepant non può bloccare l'emicrania NO-indotta in pazienti emicranici.

Questo indicherebbe che NO non agisce mediante la cessione di CGRP o che Olcegepant non ha nessun accesso al sito di rilascio di CGRP (Tvedskov *et al.*, 2009; Villalón e Olesen, 2009).

5.2.5. CGRP è rilasciato durante un attacco di emicrania?

La stimolazione del ganglio trigeminale nei gatti e negli esseri umani provoca aumenti dei livelli di sostanza P e CGRP nella circolazione cranica.

Durante gli attacchi spontanei di emicrania, CGRP è stato trovato aumentato in due studi (Goadsby *et al.*, 1990.; Gallai *et al.*, 1995).

Nel primo studio, l'aumento è stato visto solo nella vena giugulare esterna, ma non nella vena cubitale, indicando che CGRP è stato rilasciato dalla testa (probabilmente da un sito extracranico). L'altro studio ha trovato un aumento nel sangue venoso sia cranico che sistemico, suggerendo che non ci sia uno specifico rilascio cranico.

Ulteriori esperimenti hanno dato risultati che contrastano con quelli descritti. In uno studio più recente, i pazienti sono stati sottoposti a controlli confrontando i livelli di CGRP durante e al di fuori di un attacco. Questo è un progetto molto più solido perché elimina le differenze tra pazienti. Lo studio ha utilizzato lo stesso saggio degli studi precedenti sommato ad un test meglio validato e più specifico. In nessuno dei saggi c'è stato un segno di aumento di CGRP durante l'attacco né nel sangue venoso della giugulare esterna, né nel sangue della fossa cubitale (Figura.5.4).

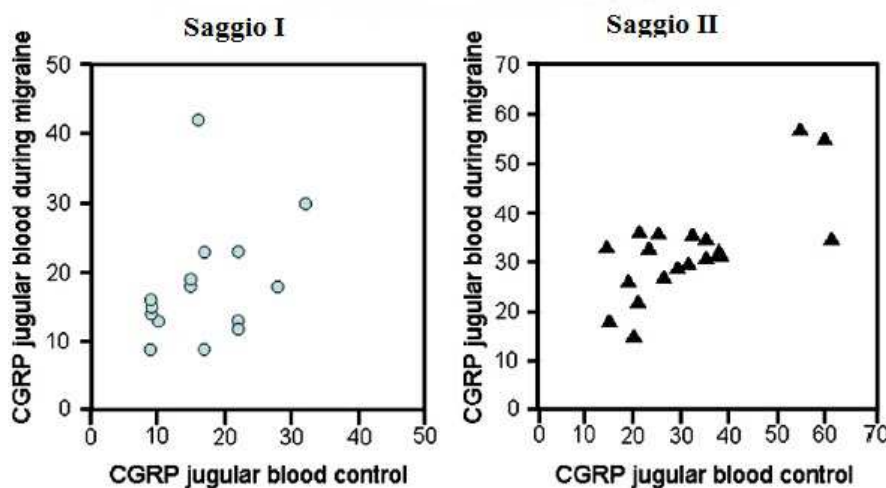


Figura 5.4. I due diversi saggi mostrano che in studi recenti non si è avuto un aumento dei livelli di CGRP nel sangue della giugulare esterna durante e al di fuori di un attacco di emicrania (Villalón e Olesen, 2009).

D'altro canto, altri studi hanno indirettamente supportato l'ipotesi di un aumento. Ad esempio, la concentrazione di CGRP diminuisce dopo trattamento degli attacchi di emicrania con un triptano, e lo stesso è stato osservato nell'uomo, per attacchi di emicrania indotti da nitroglicerina (Juhasz *et al.*, 2003). Quest'ultimo studio è limitato, comunque, dal cambiamento di parametri di efficacia a posteriori. Apparentemente, la maggior evidenza è a favore di un aumento di CGRP durante un attacco di emicrania. Lo studio migliore da un punto di vista metodologico ha dato però risultati negativi. Ulteriori studi sono dunque necessari. (Villalón e Olesen, 2009).

5.2.6. L'inibizione del rilascio di CGRP è un'opportunità terapeutica?

Lo sviluppo di agenti antiemicrania senza effetti cardiovascolari indesiderati, ma in grado di inibire la liberazione di CGRP dal trigemino eviterebbe l'azione vasocostrittrice del triptani e potrebbe rappresentare un importante

miglioramento rispetto ai trattamenti attuali. Farmaci o molecole che non sono antagonisti diretti di CGRP hanno un effetto inibitorio sul rilascio del peptide. Sono stati proposti diversi approcci:

(I) agonisti selettivi dei recettori 5-HT_{1D} , quali il derivato benzopirancarbossamidico PNU-142.633 (McCall *et al.*, 2002);

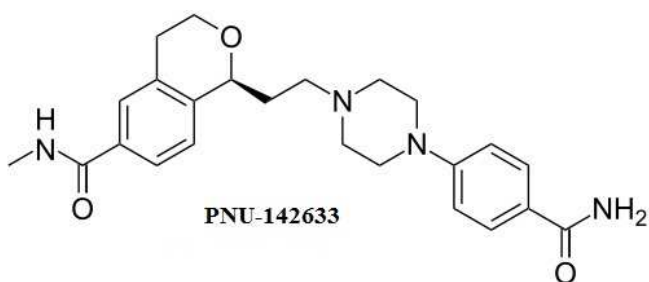


Figura 5.5.

(II) agonisti selettivi del recettore 5-HT_{1F} , come il derivato indolico LY334370 (Ramadan *et al.*, 2003).



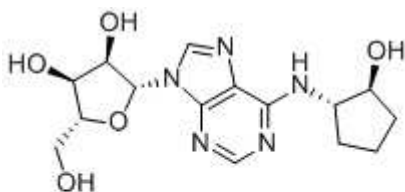
Figura 5.6. (Ramadan *et al.*, 2003)

A differenza dei triptani (agonisti dei recettori $5\text{-HT}_{1B/1D/1F}$), gli agonisti del recettore 5-HT_{1D} e 5-HT_{1F} sono privi di effetti contrattili su coronarie e sui vasi sanguigni cerebrali, inoltre, questi recettori possono avere azioni presinaptiche,

come ad esempio l'inibizione del rilascio di CGRP e della nocicezione a livello centrale.

Tuttavia, PNU-142.633 si è rivelato inefficace nel trattamento acuto dell'emicrania, mentre LY334370 ha dimostrato una certa efficacia quando usato in dosi che possono interagire con recettori 5-HT_{1B}. Sebbene studi clinici abbiano dimostrato che LY334370 è efficace nel trattamento dell'emicrania senza effetti collaterali coronarici, l'alta dose di agonisti del recettore 5-HT_{1F} confonde i risultati.

Chiaramente, sono raccomandati molti più studi sul ruolo dei recettori 5-HT_{1F} nell'emicrania. Allo stesso modo, diverse linee sperimentali hanno mostrato che gli agonisti dei recettori α_2 -adrenergici e recettori dell'adenosina A₁ inibiscono il rilascio di CGRP e la nocicezione del trigemino. Ciò è stato dimostrato da studi in vivo su agonisti selettivi del recettore A₁ dell'adenosina, in cui l'azoto dell'adenosina è sostituito con gruppi ciclici alifatici o aromatici, come GR79236.



GR79236

Figura 5.7.

Questo composto inibisce:

- vasodilatazione neurogenica nei ratti;
- nocicezione del trigemino, così come la liberazione di CGRP nei gatti e
- nocicezione trigeminale nell'uomo .

Presi insieme, questi risultati suggeriscono che GR79236 potrebbe avere un potenziale antiemicranico. In effetti, i risultati di studi clinici pilota hanno riportato che GR79236 ha azione antiemicranica, probabilmente a causa di un effetto inibitorio sui neuroni nocicettivi del trigemino ma ulteriori studi clinici sono indispensabili. La stimolazione dei recettori presinaptici α_2 -adrenergici media effetti antinocicettivi e inibisce l'espressione e il rilascio di CGRP. Quindi, agonisti selettivi di sottotipi di α_2 -adrenocettori (non ancora disponibili) potrebbero anche avere utilità come potenziali antiemicrania, tuttavia, BHT933 (un α_2 -agonista) produce anche vasocostrizione della carotide. Altri inibitori del rilascio di CGRP possono essere antagonisti del recettore vanilloide della capsaicina (capsazepina) così come agonisti dei recettori dei cannabinoidi (anandamide).

Questi agenti sembrano avere proprietà antiemicrania in studi preclinici (Villalón e Olesen, 2009).

CAPITOLO 6

ANTAGONISTI DEL RECETTORE CGRP

6.1. Scoperta degli antagonisti del recettore CGRP

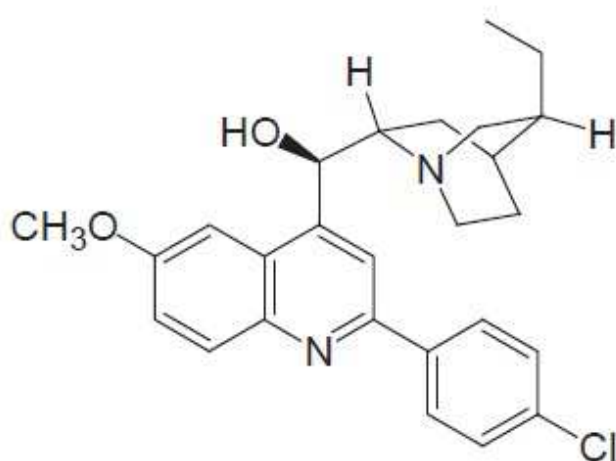
Il primo strumento con cui è stato provato l'antagonismo al recettore CGRP è stato il peptide tronco CGRP₈₋₃₇. Questo peptide è utile per esplorare la farmacologia della famiglia di recettori della calcitonina, ma non è altamente selettivo ed è improbabile che abbia adeguate proprietà fisiche per attività terapeutiche utili nel trattamento dell'emicrania acuta. Diverse aziende farmaceutiche hanno cercato di trovare piccole molecole antagoniste del recettore CGRP che avessero tutti gli attributi necessari per essere considerati farmaci contro l'emicrania.

La Famiglia B dei GPCRs ha dimostrato di essere un bersaglio difficile per sviluppare piccole molecole antagoniste, perchè il ligando endogeno è un peptide. Un antagonista ortosterico dovrebbe impedire il legame di una molecola molto più grande che probabilmente interagisce con più regioni del recettore. Nonostante la sfida sia impegnativa, diverse aziende farmaceutiche sono riuscite a generare piccole molecole antagoniste del recettore CGRP potenti e selettive.

La prima piccola molecola antagonista del recettore CGRP di natura non peptidica fu scoperta dal gruppo SmithKline Beecham (ora GlaxoSmithKline). Usando un HTS (*High-throughput screening*) su membrane polmonari suine identificarono un analogo della chinina, 2'-(4-clorofenil)diidrochinina (composto 5) (Figura 6.1) che aveva una debole potenza sui recettori ($IC_{50} = 0.6 \mu M$).

L'affinità di legame fu confermata con cellule che esprimevano recettori umani, dove il composto 5 inibiva il legame di [125 I]-CGRP con SK-N-MC, una linea cellulare di neuroblastoma che esprime il recettore umano CGRP costitutivo, con un $IC_{50} = 5.9 \mu M$. L'attività funzionale fu dimostrata nella stessa linea cellulare, dove il composto 5 bloccava la produzione di cAMP indotta da CGRP con $IC_{50} = 26 \mu M$.

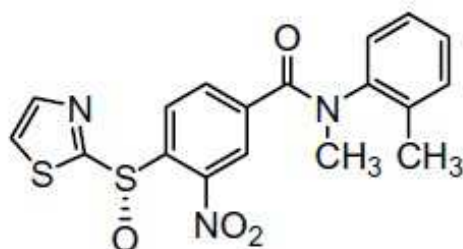
Studi delle relazioni struttura-attività hanno stabilito che il sostituito 2'-fenilico della diidrochinina era essenziale per l'attività. Tuttavia, un numero di sostituzioni 2'-ariliche diverse erano tollerate, ma nessuna di esse migliorava l'attività rispetto al composto 5 (Williams *et al.*, 2009).



COMPOSTO 5

Figura 6.1. Composto 5 (Williams *et al.*, 2009)

Poi si passò a SB-273.779 (figura 6.2) che mostrò una moderata affinità per il recettore CGRP con un valore di K_i 310 nM (Moore e Salvatore, 2012).



SB-273779

Figura 6.2. (Moore e Salvatore, 2012).

Successivamente, sempre lavorando su linee cellulari di SK-NMC, sono stati identificati altri composti (vedi Figura 6.3) che presentavano un'affinità migliore rispetto ai composti precedenti. Boehringer Ingelheim attraverso uno studio HTS ha identificato ammidi dipeptidiche (R)-Tyr-(S)-Lys debolmente attive, come il composto (8), con affinità micromolare ($IC_{50} = 17 \mu M$ su cellule SK-N-MC). La configurazione assoluta era essenziale per l'attività, perché la sintesi di altri stereoisomeri portava a composti inattivi. Sono stati effettuati altri studi SAR in cui erano variate le parti N- e C- terminali della molecola e i due amminoacidi, lasciando invece invariato il resto della struttura. Usando questa strategia, N-(4-piridinil)piperazina è stata identificata come ammido C-terminale ottimale (composto (9), $IC_{50} = 10.3 \mu M$) (Williams *et al.*, 2009).

Un aumento significativo della potenza è derivato da un irrigidimento del componente fenilalchilamidico per sostituzione con gruppi contenenti la funzione dell'urea e N-(2-metossifenil)piperidina (10) ($IC_{50} = 250$ nM).

Un altro fattore-chiave è stata l'introduzione di gruppi donatori/accettori di legami a idrogeno, come nel derivato carbossamidico (11), con $IC_{50} = 4.5$ nM.

L'inserimento dei gruppi arilici e i gruppi accettori/donatori di legami a idrogeno all'interno di un sistema biciclico eterociclico ha portato a prodotti con affinità sub-nanomolare, come il composto (12), con $IC_{50} = 0.2$ nM e BIBN4096BS (Olcegepant), con $IC_{50} = 0.03$ nM. Anche mono-eterocicli con gruppi che formano legami a idrogeno arilsostituiti erano piuttosto attivi, come il composto (13), con $IC_{50} = 0.05$ nM (Williams *et al.*, 2009).

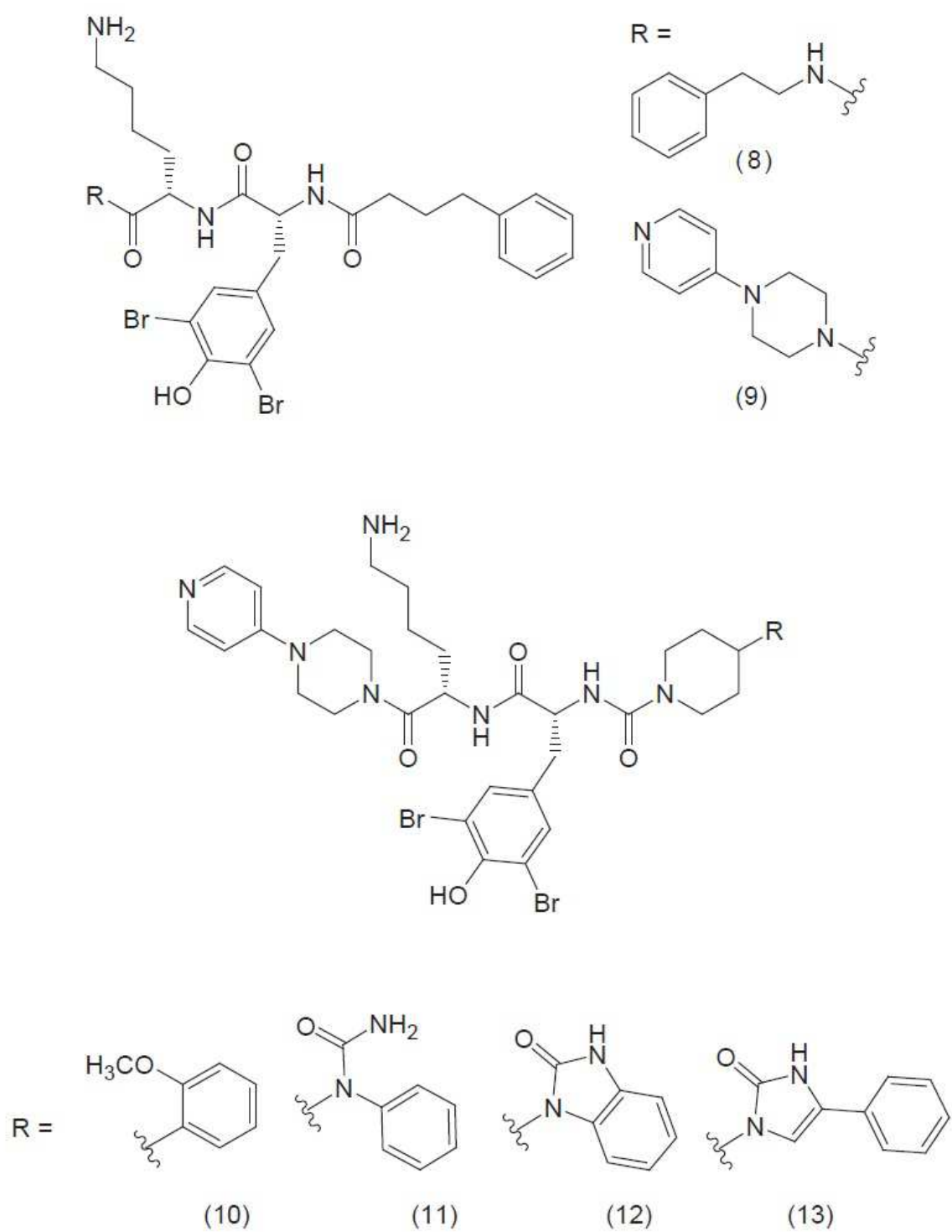
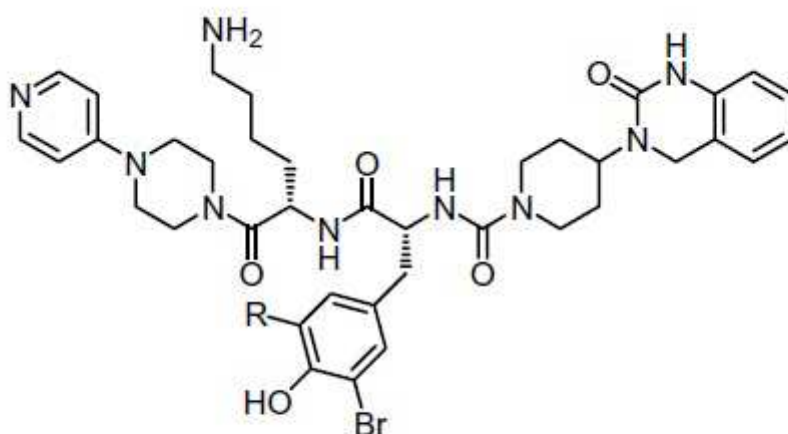


Figura 6.3. (Williams et al., 2009)

BIBN4096 (Olcegepant) è stato ottenuto per inserimento di una funzione chinazolonica nella porzione N-terminale piperidinica (Figura 6.4): sviluppato da Boehringer Ingelheim, è stato il primo vero potente antagonista della produzione di cAMP mediata da CGRP nelle cellule SK-N-MC.

Sebbene questo composto sia estremamente potente e selettivo per il recettore CGRP, occorre precisare che è una molecola relativamente grande (peso molecolare = 870) con bassa biodisponibilità, che le impone di essere somministrata per via endovenosa in clinica.

Tuttavia, questo composto è stato testato nell'uomo per il trattamento acuto di emicrania e ha dato prova della validità di questo meccanismo, che rappresenta un importante passo avanti nel campo (Moore e Salvatore, 2012).

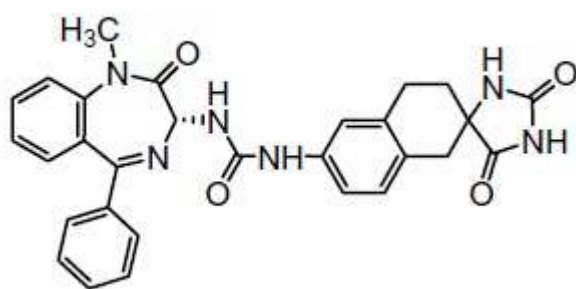


OLCEGEPANT

Figura 6.4. (Moore e Salvatore, 2012)

Purtroppo, una somministrazione endovenosa del farmaco non è pratica per il trattamento acuto di emicrania in quanto ciò richiederebbe un una trasporto in clinica dopo l'inizio dell'attacco. L'emicrania è principalmente gestita in regime ambulatoriale: pertanto, per essere pratico e commercialmente valido, un

farmaco deve essere biodisponibile per via orale, permettendo al paziente di assumerlo quando i sintomi di un attacco cominciano (Moore e Salvatore, 2012). Merck & Co. si misero alla ricerca di un farmaco biodisponibile per via orale attraverso un HTS che ha portato alla identificazione del composto *lead* a struttura benzodiazepinica denominato Composto 2 (Figura 6.5). Questo composto mostrava una modesta affinità per il recettore CGRP umano ($K_i = 4,8 \mu\text{M}$) (Moore e Salvatore, 2012).

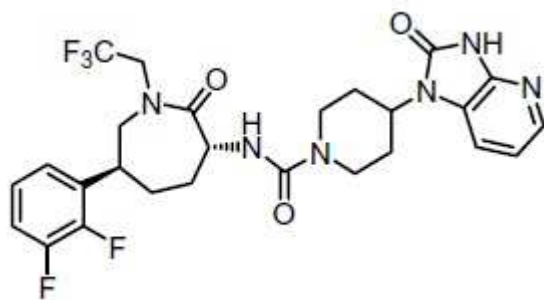


COMPOSTO 2

Figura 6.5. (Moore e Salvatore, 2012)

L'ottimizzazione ha poi portato ad una potente molecola, Telcagepant (Figura 6.6), che ha un K_i 0,8 nM.

Telcagepant è stato il primo antagonista del recettore CGRP biodisponibile per via orale da testare in clinica e ha mostrato un'efficacia per il trattamento dell'emicrania simile a quella di un triptano (Moore e Salvatore, 2012).



TELCAGEPANT

Figura 6.6. (Moore e Salvatore, 2012)

Merck in seguito ha sviluppato un altro antagonista del recettore CGRP più potente, MK-3207 (Figura 6.7), che ha mostrato efficacia per il trattamento acuto dell'emicrania in uno studio di fase IIb (Moore e Salvatore, 2012).



MK-3207

Figura 6.7. (Moore e Salvatore, 2012)

Il gruppo Bristol-Myers Squibb ha poi sintetizzato BMS-694.153 (Figura 6.8) che ha alta affinità per il recettore CGRP nell'uomo ($K_i = 13$ pM). BMS-694153 però non ha evidenziato significativa biodisponibilità orale nella scimmia o nel ratto;

inoltre, non sono stati pubblicati dati clinici per questo composto (Moore e Salvatore, 2012).

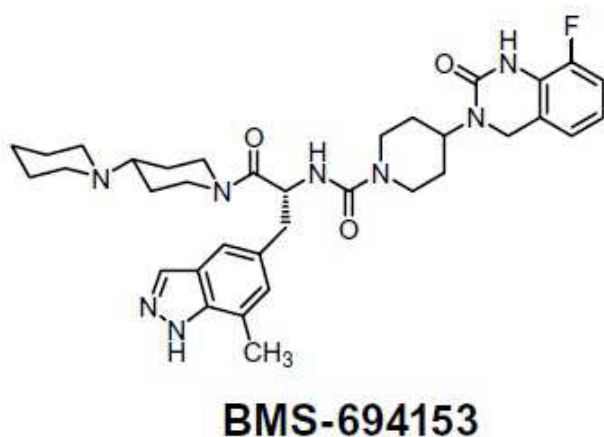


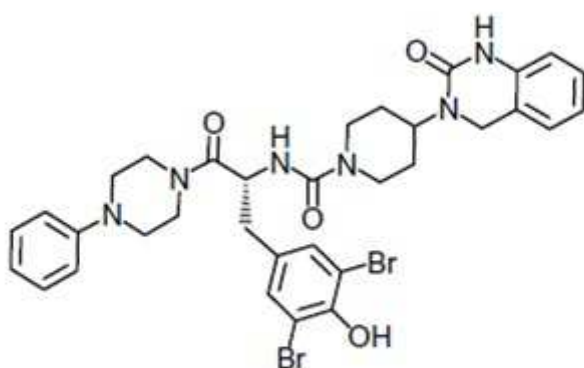
Figura 6.8. (Moore e Salvatore, 2012).

6.2. Selettività di specie degli antagonisti del recettore CGRP- Ruolo di RAMP1.

Gli antagonisti del recettore CGRP presentano una selettività di specie.

Olcegepant (Figura 6.4) mostra alta affinità per i recettori CGRP umani e non umani (primati) però mostra minore affinità per i recettori dei ratti, conigli, cani e cavie (Dood *et al.*, 2000).

Un composto correlato, “composto 1” (Figura 6.9), è un antagonista più potente sulle arterie cerebrali umane che su arterie cerebrali di cavie e coronarie di maiale.



COMPOSTO 1

Figura 6.9. (Moore e Salvatore, 2012)

Pertanto, non è sorprendente che sia Telcagepant che MK-3207 abbiano mostrato una affinità per il recettore CGRP di *rhesus* ma affinità minore di ben 100 volte per i recettori di ratto e cane (Salvatore *et al.*, 2008).

MK-3207 (Figura 6.7) è strutturalmente diverso da Telcagepant (Figura 6.6) ma mostra comunque affinità per i recettori umani e di *rhesus* di circa 400 volte maggiore rispetto a quella di ratto e di cane. BMS-649153 della Bristol-Myers Squibb (Figura 6.8) ha alta affinità per il recettore CGRP umano e di bertuccia, ma è inattivo sul recettore di ratto fino a 1 mM.

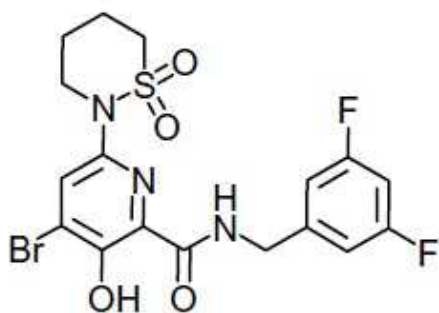
Mallee e colleghi (Mallee *et al.*, 2002) cercarono quindi di determinare quali fossero le regioni del recettore CGRP responsabili di questa selettività di specie esprimendo complessi recettoriali di CLR/RAMP di specie miste cioè CLR umano e RAMP1 di ratto.

Essi scoprirono che Olcegepant su un recettore composto da CLR di ratto e RAMP1 umana mostra potenza simile a quella del recettore completamente umano, mentre la sua potenza su CLR umano e RAMP1 di ratto era simile a quella sul recettore completamente di ratto.

Questa scoperta suggerisce che la selettività de specie sia principalmente guidata da RAMP1 piuttosto che da CLR.

Utilizzando una RAMP1 chimerica di ratto e uomo è stato possibile restringere le regioni di RAMP1 responsabili della selettività di specie, ovvero i residui 66-112.

Infine, i ricercatori hanno mostrato che cambiando i residui 74 su RAMP1 di ratto, sostituendo la lisina con il triptofano, quest'ultimo conferisce a Olcegepant una farmacologia simile a quella esercitata sull'uomo. E' interessante notare come Salvatore *et al.*, successivamente abbiano individuato un composto strutturalmente diverso (composto 4) (Figura 6.10), il quale mostra affinità simile per i recettori umani e di ratto, suggerendo che questo composto si lega ad una regione diversa del recettore (Moore e Salvatore, 2012).



COMPOSTO 4

Figura 6.10. (Moore e Salvatore, 2012)

6.3. Determinanti molecolari del recettore CGRP per il legame all'antagonista

La scoperta dell'importanza di Trp74 nella RAMP1 umana ha dimostrato come questa sia essenziale per il legame con l'antagonista.

La mutagenesi del triptofano al residuo 74 di RAMP1 umana riduce significativamente la potenza sia di Telcagepant che di Olcegepant (Tabella 6.1) (Hay *et al.*, 2006a; Miller *et al.*, 2010; Moore *et al.*, 2010), in linea con l'affermazione iniziale che dice che il residuo 74 è critico per l'alta affinità di legame (Mallee *et al.*, 2002). Trp74 di RAMP1 umana svolge un ruolo chiave anche nell'alta affinità di legame di MK-3207 (Tabella 6.1) (Salvatore *et al.*, 2010). SB-273779 non è stato invece influenzato dalla mutazione in posizione 74, il che suggerisce che esso si leghi ad una regione diversa del recettore (Tabella 6.1) (Miller *et al.*, 2010). Kusano *et al.* hanno pubblicato una struttura cristallina della regione extracellulare di RAMP1, che forniva residui supplementari (Arg67, Asp71, Glu78 e Trp84) che potessero interagire con piccole molecole antagoniste del recettore CGRP (Kusano *et al.*, 2008). La sostituzione con alanina di Arg67 ha avuto un modesto effetto sulla potenza di Telcagepant ma non su quella di Olcegepant, mentre la sostituzione di Asp71 e Glu78 non ha avuto effetto (Moore *et al.*, 2010). Inoltre, è stato dimostrato che anche il triptofano in posizione 84 è importante per la potenza di Telcagepant, infatti cambiare questo residuo con alanina significa ridurre la potenza della molecola. (Tabella 6.1) (Moore *et al.*, 2010).

E' interessante notare che anche la potenza dell'agonista peptidico CGRP è risultata fortemente ridotta dalla mutazione Trp84Ala: per la prima volta un residuo appare importante sia per il legame degli agonisti che per quello degli antagonisti; questo risultato è in accordo con l'ipotesi che N-terminale di RAMP1 formi un'area di legame con N-terminale di CLR (Moore *et al.*, 2010).

Antagonist	Mutation	Potency (nM)	Reference
Olcegepant	Wild type	0.07 (A ₂)*	Miller <i>et al.</i> (2010)
	RAMP1 Trp74Lys	7.4 (A ₂)*	Miller <i>et al.</i> (2010)
	CLR Met42Ala	1.1 (A ₂)*	Miller <i>et al.</i> (2010)
	Wild type	0.07 (K ₈)*	Hay <i>et al.</i> (2006a)
	RAMP1 Trp74Lys	3.9 (K ₈)*	Hay <i>et al.</i> (2006a)
Telcagepant	RAMP1 Trp74Ala	7.6 (K ₈)*	Hay <i>et al.</i> (2006a)
	Wild type	0.5 (IC ₅₀)*	Moore <i>et al.</i> (2010)
	RAMP1 Trp74Ala	52 (IC ₅₀)*	Moore <i>et al.</i> (2010)
	RAMP1 Trp84Ala	9.1 (IC ₅₀)*	Moore <i>et al.</i> (2010)
	Wild type	0.2 (A ₂)*	Miller <i>et al.</i> (2010)
	RAMP1 Trp74Lys	51 (A ₂)*	Miller <i>et al.</i> (2010)
MK-3207	CLR Met42Ala	162 (A ₂)*	Miller <i>et al.</i> (2010)
	Wild type	0.1 (IC ₅₀)	Salvatore <i>et al.</i> (2010)
	RAMP1 Trp74Ala	2.2 (IC ₅₀)	Salvatore <i>et al.</i> (2010)
SB-273779	Wild type	79 (A ₂)*	Miller <i>et al.</i> (2010)
	RAMP1 Trp74Lys	78 (A ₂)*	Miller <i>et al.</i> (2010)
	CLR Met42Ala	83 (A ₂)*	Miller <i>et al.</i> (2010)

Tabella 6.1. (Moore e Salvatore, 2012)

Sono state poi esplorate le regioni importanti per il legame con CLR.

Salvatore e colleghi hanno costruito chimere di CLR e del recettore della calcitonina umani che mostravano che i residui 37-63 di CLR sono importanti per l'affinità un composto strettamente analogo a Olcegepant in cui l'atomo di bromo è sostituito con uno di iodio (Salvatore *et al.*, 2006). Successivamente la mutagenesi con alanina mostrò che la metionina al residuo 42 è importante per la potenza di Telcagepant e Olcegepant (Tabella 6.1), con Telcagepant molto più sensibile a questa mutazione in CLR.

La somma di questi dati dimostra che le porzioni extracellulari sia in CLR che in RAMP1 sono importanti per il legame ad alta affinità degli antagonisti del recettore CGRP come Olcegepant e Telcagepant.

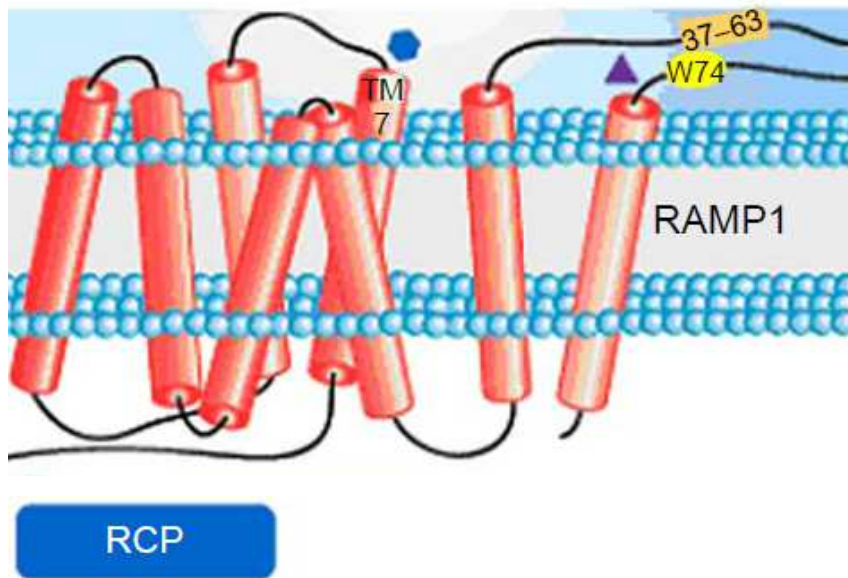


Figura 6.11. Regioni extracellulari di RAMP1 e CLR importanti per il legame con gli antagonisti (Williams *et al.*, 2009)

Il contatto sia con CLR e RAMP1 è esattamente ciò che è necessario per ottenere selettività per CGRP contro altri recettori contenenti il CLR (AM1 e AM2) e contenenti RAMP1 (AMY1). Il modello d'interazione di molecole come Telcagepant e Olcegepant è rappresentato nella Figura 6.12.

6.4. Indagini cliniche

OLCEGEPANT (BIBN4096)

Olcegepant servì per dimostrare la capacità che gli antagonisti del recettore CGRP hanno di trattare attacchi acuti di emicrania.

Doods *et al.* (2000) e Rudolf *et al.* (2005) trovarono che Olcegepant produceva un antagonismo selettivo del peptide α -CGRP in arterie cerebrali e extracerebrali umane isolate.

Olcegepant presentava una scarsa biodisponibilità orale, quindi necessariamente doveva essere somministrato per via endovenosa.

Su questo prodotto furono condotti degli studi per valutarne la sicurezza, la tollerabilità e il profilo farmacocinetico.

In un primo studio (Iovino *et al.*, 2004) i ricercatori stabilirono che la somministrazione endovenosa di Olcegepant presentava un favorevole profilo di sicurezza. Non furono osservati cambiamenti clinicamente rilevanti, indotti dal farmaco, della pressione sanguigna, del ritmo del polso, della frequenza respiratoria, dell'elettrocardiogramma, degli esami di laboratorio, o del flusso sanguigno dell'avambraccio anche alla dose più alta sperimentata (10 mg).

In un secondo studio (Petersen *et al.*, 2005) fu esaminato se Olcegepant potesse causare vasocostrizione a livello cerebrale. I ricercatori osservarono che questo composto non causava variazioni sulla velocità del flusso sanguigno dei vasi cerebrali e quindi non causava rischi per l'attività cerebrovascolare.

In seguito gli stessi ricercatori hanno condotto delle ricerche per capire se Olcegepant era in grado di inibire il mal di testa, quando indotto da CGRP, in volontari sani. L'esito fu che era in grado di inibire l'attacco di emicrania, ma fu anche notato che questo composto aveva scarse capacità di oltrepassare la barriera ematoencefalica.

Uno studio clinico di fase II placebo-controllato, doppio-cieco, randomizzato, multicentrico condotto su 126 pazienti, fornì la prima prova del fatto che gli antagonisti del recettore CGRP sono realmente efficaci nel trattamento acuto dell'emicrania.

Ai volontari fu somministrato Olcegepant per via endovenosa. I pazienti dopo 30 minuti notarono un'attenuazione del dolore che migliorava con il passare del tempo e non furono osservati importanti effetti collaterali indotti dal farmaco (Moore e Salvatore, 2012; Villalón e Olesen, 2009).

TELCAGEPANT (MK-9074)

Telcagepant fu il primo antagonista del recettore CGRP biodisponibile per via orale ad essere testato clinicamente.

In uno studio randomizzato, in doppio cieco, con placebo e con controllo attivo (rizatriptan) di fase II b, 420 pazienti furono trattati con dosi di Telcagepant che andavano da 25 a 600mg (Ho *et al.*, 2008b).

Dosi di Telcagepant di 300-600 mg si dimostrarono più efficaci del placebo nel trattamento di attacchi di emicrania moderata o grave. Le misurazioni venivano fatte dall'inizio fino al primo punto di sollievo dal dolore e a 2h. Altri punti finali rispecchiarono la prima conclusione, tra cui la libertà dal dolore e il miglioramento dei sintomi associati.

L'efficacia di Telcagepant (150-300 mg) fu successivamente studiata in una prova di fase III. Fu uno studio randomizzato, doppio cieco, placebo e controllo attivo (zolmitriptan 5mg) che fu eseguito per valutare l'efficacia e la tollerabilità di Telcagepant in pazienti che presentavano un attacco acuto di emicrania. Telcagepant a dosi di 300 mg si dimostrò molto più efficace del placebo nell'eliminare dolore, fonofobia, fotofobia e nausea.

L'efficacia di Telcagepant 300 mg e zolmitriptan 5mg fu molto simile, ed entrambi risultarono molto più efficaci di Telcagepant 150 mg.

Telcagepant fu generalmente ben tollerato con un indice di eventi avversi paragonabile a quelli del placebo. In seguito fu condotta una seconda sperimentazione clinica di fase III per confermare l'efficacia di Telcagepant (Connor *et al.*, 2009). In questo studio, Telcagepant 300 mg e 150 mg furono più efficaci del placebo nel fornire libertà dal dolore, sollievo dalla pena, assenza di fono- e fotofobia e nausea, dopo due ore dall'assunzione.

In uno studio per valutare la sicurezza a lungo termine e la tollerabilità nel trattamento intermittente per attacchi acuti di emicrania, Telcagepant fu somministrato a 640 pazienti che lo assunsero per trattare fino a 8 attacchi di emicrania al mese per 18 mesi. In questo studio, Telcagepant fu generalmente ben tollerato e ci furono meno eventi avversi rispetto a quelli che avvengono comunemente con l'utilizzo dei triptani, i quali possono provocare astenia, dolore al petto, tensione al torace e parestesia.

Questo ha dimostrato che il profilo degli effetti collaterali con somministrazione intermittente, come richiesto nel trattamento acuto dell'emicrania, è eccellente.

Tuttavia, Merck & Co. hanno riscontrato, in prove di fase II che prevedevano la somministrazione di Telcagepant a scopo profilattico, un aumento dei livelli delle transaminasi, in un piccolo numero dei soggetti trattati. Questi individui avevano assunto due dosi giornaliere di Telcagepant 140 o 280 mg per 3 mesi. La dose giornaliera in regime di profilassi era però ben diversa dalla dose usata negli studi di fase III in cui Telcagepant era somministrato ad intermittenza, cioè solo ed esclusivamente durante un attacco acuto di emicrania (Moore e Salvatore, 2012).

CAPITOLO 7

SINTESI di TELCAGEPANT

[*N*-[(3*R*,6*S*)-6-(2,3-difluorofenil)-2-oxo-1-(2,2,2-trifluoroetil)azepan-3-il]-4-(2-oxo-2,3-diidro-1*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-1-il)piperidin-1-carbossammide].

Sviluppato da Merck e Co., questo potente antagonista del recettore CGRP è costituito da un nucleo caprolattamico (3*R*)-ammino-(6*S*)-difluorofenil sostituito, connesso attraverso un ponte ureidico ad un nucleo piperidinico 4-sostituito. La stereochimica (3*R*),(6*S*) e il sostituito in 6 sono importanti per l'affinità recettoriale. Inoltre il sostituito trifluoroetilico in posizione 1 garantisce una buona affinità recettoriale e convenienti proprietà farmacocinetiche (Paone *et al.*, 2007).

Questo composto presenta una buona affinità per il recettore CGRP umano ($K_i = 0.8\text{nM}$) e inoltre ha una biodisponibilità orale del 20-80% a seconda della specie esaminata.

La sintesi del Telcagepant può essere condotta seguendo due vie di sintesi: la prima sfrutta come processo-chiave la chiusura ad anello per metatesi olefinica, la seconda utilizza invece la reazione di Hayashi-Miyaura.

7.1. Prima via di sintesi del Telcagepant

a prima via di sintesi generale (Figura 7.2) riguarda la serie di antagonisti CGRP che ha portato alla scoperta del Telcagepant; è stata eseguita attraverso la chiusura ad anello per metatesi olefinica del nucleo centrale caprolattamico.

E' stato scelto di usare questo metodo di sintesi poiché consentiva una facile e indipendente variazione dei sostituenti R^1 ed R^2 .

La metatesi olefinica è un metodo versatile per la formazione di legami carbonio-carbonio. Si tratta di una ridistribuzione di doppi legami carbonio-carbonio catalizzata da metalli. Può essere applicata a sintesi come polimerizzazione, chiusura di anelli, apertura di anelli, fornendo molecole insature difficili o impossibili da ottenere con altri metodi (Trnka e Grubbs, 2001). L'uso di questa reazione è aumentato negli ultimi anni grazie ai progressi nella scoperta di nuovi catalizzatori. Il meccanismo proposto per la reazione, illustrato nella Figura 7.1, coinvolge l'interconversione di un'olefina a metallo-alchilidene. Si pensa che il processo avvenga tramite un metallo-ciclobutano intermedio formatosi per cicloaddizione $[2 + 2]$. I catalizzatori impiegati con successo in questa reazione sono spesso a base di rutenio.

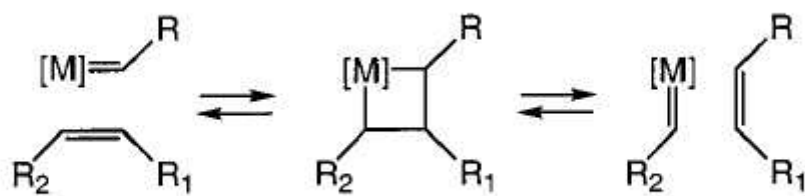


Figura 7.1. Meccanismo della metatesi olefinica (Trnka e Grubbs, 2001)

La via sintetica per la preparazione della serie di derivati cui appartiene Telcagepant (Figura 7.2) parte con l'alchilazione della 2,4 dimetossibenzilammina cloridrato con 2,3-dibromopropene; la successiva condensazione con *D*-alligicina protetta con un gruppo benzilossicarbonilico

Cbz) in presenza di 1-(3-dimetilamminopropil)-3-etilcarbodiimmide (EDC) fornisce il diene **6**.

La ciclizzazione è effettuata con il catalizzatore rutenio di Grubbs di seconda generazione. Si procede con la reazione di *coupling* di Suzuki con vari acidi boronici e con l'idrogenazione del derivato dello stirene, insieme alla protezione con Boc che avviene *in situ*; si ottiene una miscela cis/trans, prontamente separabile. Il desiderato isomero trans è poi sottoposto ad alchilazione dell'ammide con vari elettrofili e la de-protezione con acido trifluoroacetico, seguita da un'addizione di azabenzimidazolon piperidina, porta al prodotto ureidico finale **9** (Paone *et al.*, 2007).

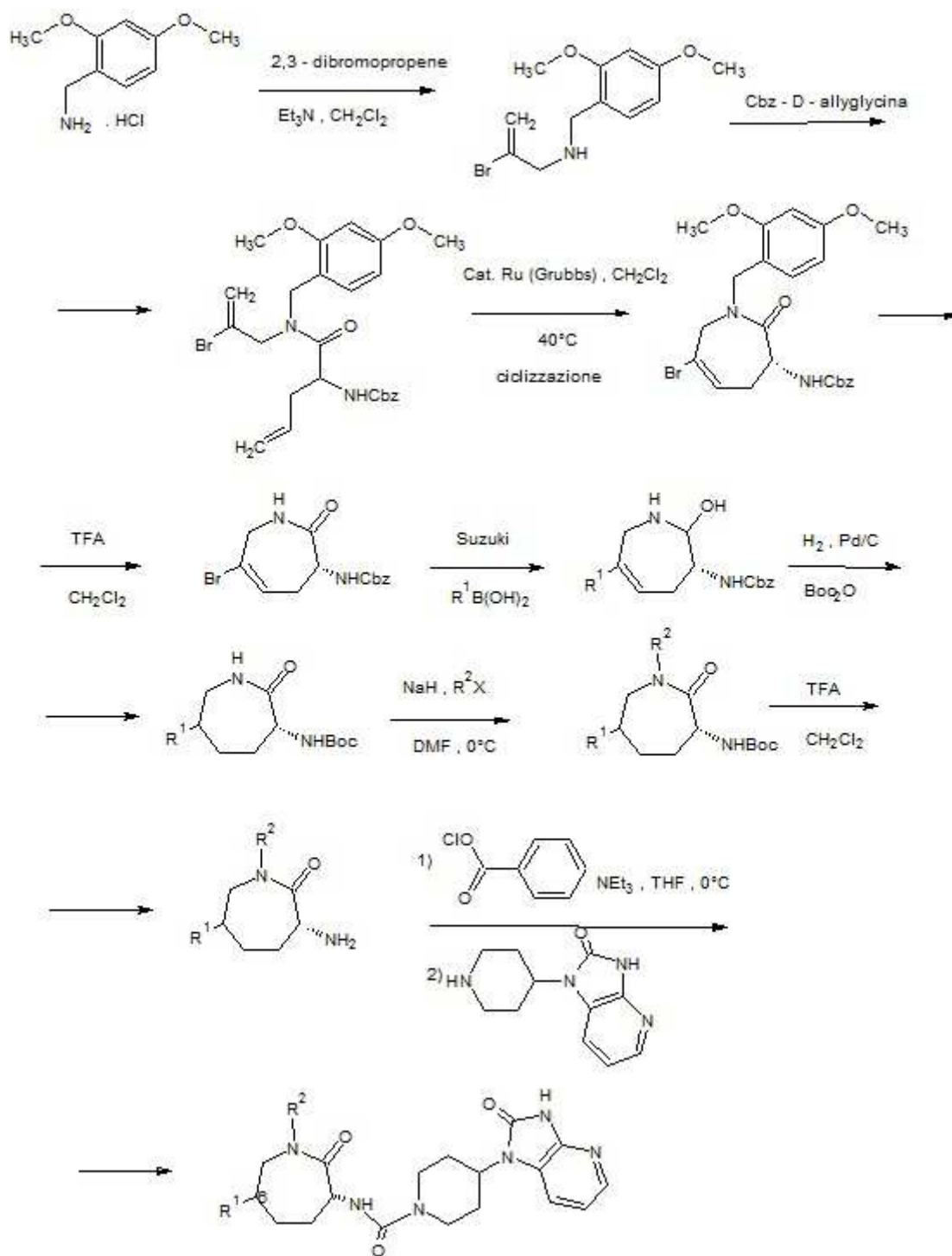


Figura 7.2. Schema di sintesi della serie di derivati a nucleo caprolattamico.

Furono eseguite diverse sostituzioni dei gruppi R, per vedere quali fossero i sostituenti più attivi.

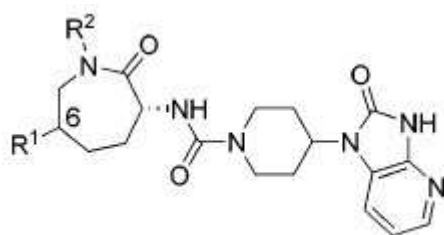
Le ricerche iniziali sulla posizione arilica furono compiute isolando e testando il composto finale in una miscela 1:1 cis/trans, priva di sostituzioni ammidiche, per consentire l'aumento dell'efficienza delle SAR (Tabella 7.1), dopodichè fu variato il sostituente ammidico R² per cercare di aumentare la potenza. Gli Autori si focalizzarono su composti che avessero gruppi polari sulla catena laterale. Tuttavia, la biodisponibilità orale era molto bassa, poiché nella maggior parte dei casi la catena laterale dei derivati ammidici era soggetta a *N*-dealkilazione e ad elevati valori di clearance.

Sostituzioni eteroariliche sull'ammide furono utilizzate come mezzo per introdurre polarità.

In generale la catena laterale ammidica composta di piccoli gruppi alchilici forniva composti che presentavano il miglior profilo farmacocinetico della serie. Derivati fluorochilici risultarono dalle 2 alle 3 volte più potenti, come ad esempio il trifluoroetil derivato **38** che presentava IC₅₀ 11 nM.

Questo composto inoltre mostrava EC₅₀ 120 nM, EC₉₀ 1000 nM, una bassa clearance (7.0 mL min⁻¹ kg⁻¹) e una buona emivita endovenosa (2.8 h) nelle scimmie *rhesus*.

Inoltre il composto **38** mostrava selettività >10000 volte in un pannello di test che rappresentava più di 160 recettori, trasportatori ed enzimi e fu selezionato come candidato clinico (Paone *et al.*, 2007).



compd	stereo ^a	R ¹	R ²	K _i ^b (nM)	cAMP IC ₅₀ ^c (nM)	cAMP + 50% human serum IC ₅₀ (nM)	shift (fold) ^d	rat F ₅₀ ^e (%)	dog F ₅₀ ^f (%)
4	S	phenyl	cyclopropylmethyl	11 ± 2.9	38	340	9	7	41
10	S	phenyl	H	83	520	700	1.3		
11	R,S	4-hydroxyphenyl	H	770	1000				
12	R,S	2-pyridinyl	H	4400					
13	R,S	3-pyridinyl	H	9900					
14	R,S	3-thiophene	H	470	750	1800	2.4		
15	R,S	2-methoxyphenyl	H	1700					
16	R,S	4-methylphenyl	H	1100					
17	R,S	isopropyl	H	470	380	620	1.6		
18	R,S	benzyl	H	610	920				
19	R,S	2-fluorophenyl	H	37 ± 7.0	150	250	1.7		
20	R,S	3-fluorophenyl	H	93	340				
21	S	2-fluorophenyl	H	22	65	120	1.8		
22	S	3-fluorophenyl	H	51	220	250	1.1		
23	S	2,3-difluorophenyl	H	3.6	14	22	1.6	5	30
24	S	2,3-difluorophenyl	2-methoxyethyl	0.3	2	3	1.5	6	6
25	S	2,3-difluorophenyl	2-hydroxyethyl	4.2	15	23	1.5	<1	
26	S	2,3-difluorophenyl	2-trifluoromethoxyethyl	0.19 ± 0.03	1	6	6	3	7
27	S	2,3-difluorophenyl	2-dimethylaminoethyl	4.9	16	8	1	2	
28	S	2,3-difluorophenyl	2-morpholinylethyl	0.5	4	3	1	2	1
29	S	2,3-difluorophenyl	(2-pyridinyl)methyl	0.9	2	10	5	12	12
30	S	2,3-difluorophenyl	2-methylthioethyl	0.7	2	8	4	1	
31	S	2,3-difluorophenyl	2-(methylsulfinyl)ethyl	1.7	8	5	1		
32	S	2,3-difluorophenyl	2-(methylsulfonyl)ethyl	0.5	3	2	1		
33	S	2,3-difluorophenyl	cyclopropylmethyl	1.4	2	21	11	8	17
34	S	2,3-difluorophenyl	methyl	2.7 ± 0.4	8	22	2.8	12	60
35	S	2,3-difluorophenyl	ethyl	2.4 ± 0.9	6	30	5	30	61
36	S	2,3-difluorophenyl	2-fluoroethyl	1.4	5	10	2	17	14
37	S	2,3-difluorophenyl	2,2-difluoroethyl	0.9	5	15	3	25	11
38	S	2,3-difluorophenyl	2,2,2-trifluoroethyl	0.77 ± 0.07	2.2 ± 0.3	11 ± 2.1	5	20	35

Tabella 7.1. Potenza e biodisponibilità orale di derivati con nucleo caprolattamico antagonisti del recettore CGRP (Paone *et al.*, 2007)

L'applicazione dello schema di sintesi al solo Telcagepant è illustrata nella figura 7.3. Si può osservare che la reazione di *coupling* con acido 2,3-difluorofenil boronico in questo caso è effettuata sul diene **6**, cioè prima della ciclizzazione per metatesi olefinica. L'altro passaggio che si differenzia dalla sintesi generale della serie di derivati è l'utilizzo di 2,2,2-

trifluoroetilclorometansolfonato a bassa temperatura (-30 °C) per l'introduzione del gruppo R².

La de-protezione dell'ammina primaria (**2**) seguita dalla formazione dell'urea con piperidina (**12**) porta ad una buona resa di Telcagepant (**1**) (Burgey *et al.*, 2008).

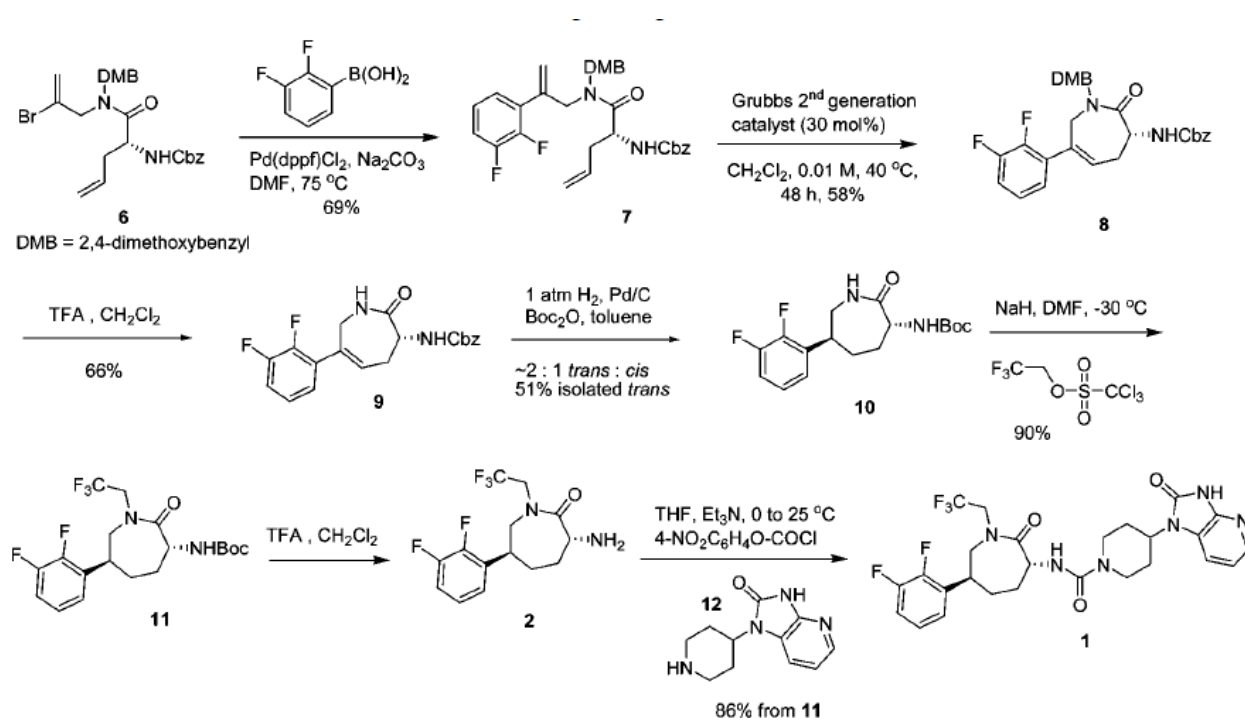


Figura 7.3. Sintesi di Telcagepant attraverso la chiusura dell'anello per metatesi olefinica (Burgey *et al.*, 2009)

Bisogna però dire che questa via di sintesi permette di sviluppare quantità limitate di Telcagepant e presenta numerosi svantaggi: è una reazione inefficiente, che richiede quantità consistenti di catalizzatore (Ru 30 mol %), inoltre è poco diastereoselettiva, pertanto porta alla formazione di una miscela *cis*/*trans* (Burgey *et al.*, 2009).

7.2. Seconda via di sintesi del Telcagepant

Il passaggio chiave che viene utilizzato nel secondo percorso di sintesi del Telcagepant sfrutta la reazione di Hayashi-Miyaura.

Questa sintesi catalitica asimmetrica è un campo di grande importanza per la sua utilità pratica, nonché per l'interesse scientifico che ha suscitato.

Nel 1998, Hayashi e Miyaura realizzarono il primo esempio di reazione di addizione 1,4-asimmetrica di acidi alchil e arilboronici usando un complesso rodio-fosfina come sistema catalitico.

Questa reazione prevede:

- (1) L'uso di Rh (acac) (C₂H₄)₂ come precursore del catalizzatore,
- (2) Binap come ligando chirale bifosfinico,
- (3) Un'alta temperatura di reazione (100 °C),
- (4) L'uso di una miscela diossano/acqua in un rapporto di 10/1 come solvente.

Questa reazione è il metodo migliore per l'introduzione enantioselettiva di gruppi arilici e alchilici in posizione beta di olefine povere di elettroni; può essere applicata ai nitro alcheni, che sono buoni substrati.

Nella Figura 7.4 è riportato l'esempio di una reazione di 1-nitrocicloesene con un acido fenilboronico, in presenza del catalizzatore rodio/(S)-binap ad una temperatura di 100 °C per 3 h. Come prodotto finale si ottiene il 2-fenil-1-nitrocicloesano con una resa dell'89%.. (Hayashi e Yamasaki, 2003).

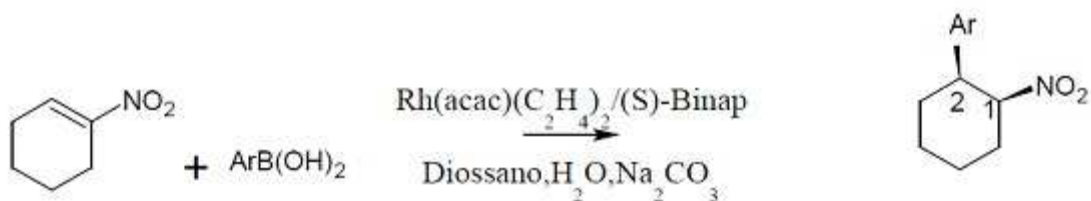


Figura 7.4. Reazione di addizione 1,4- asimmetrica di un acido arilboronico in presenza di un complesso rodio-fosfina come sistema catalitico

Vediamo ora l'applicazione di questa reazione nella sintesi del Telcagepant (Figura 7.5).

La reazione fa uso del derivato dell'acido *D*-glutammico protetto sul gruppo amminico e su uno dei gruppi carbossilici (**13**), disponibile in commercio, che è trasformato in di-estere attraverso due passaggi, con una resa complessiva di 81% e successivamente è sottoposto a una semiriduzione selettiva del gruppo estereo in posizione γ con DIBAL-H per dare l'aldeide (**15**), la quale viene poi usata in una reazione di Henry con nitrometano (toluene, catalizzatore tetrametilguanidina). Successivamente, per addizione di metansolfonil cloruro e trietilammina avviene eliminazione di acqua dall'intermedio nitroalcolico per dare il derivato nitro-olefinico (**16**) con una buona percentuale di resa.

Ottenuto il composto (**16**) (nitroalchene) su di esso è stato possibile eseguire la reazione di Hayashi-Miyaura.

L'applicazione delle normali condizioni descritte in letteratura (3 mol % Rh(acac)(C₂H₄)₂ /BINAP, 10:1 diossano/acqua, 100°C) ha portato ad una rapida idrolisi dall'acido 2,3-difluorofenilboronico a 1,2-difluorobenzene. Sono stati allora studiati catalizzatori più attivi che accelerassero la reazione.

L'addizione di basi inorganiche a queste reazioni di addizione catalizzate dal rodio ha dimostrato di aumentare il tasso di accelerazione. Studi per ottimizzare la reazione hanno dimostrato che NaHCO₃ (0.5 equiv.) è un efficace additivo che permette la realizzazione di una migliore procedura che va a completezza nel giro di 6-12 h a 35° con una quantità di catalizzatore di Rh(acac)(C₂H₄)₂/BINAP 2.5mol % e acido boronico (2.5 equiv.).

Questa reazione, che risulta essere migliore e riproducibile, porta ad un prodotto caratterizzato da un'alta diastereoselettività (96%, 93:7) su una scala di 2 kg.

L'esaustiva idrogenolisi del nitroalcano estere (**17**) Pd/C-catalizzata porta all'amminoacido (**18**), il quale è direttamente sottoposto a ciclizzazione da parte

di ECD per dare il caprolattame di-Boc-protetto (**19**) con una resa media nei due passaggi del 65% .

La deprotezione selettiva, con acido trifluoroacetico in diclorometano, converte il composto (**19**) nell'azepanone (**10**), il quale è identico al prodotto intermedio che si ottiene dalla precedente via sintetica mediante metatesi olefinica ed è servito a confermare l'esito stereochimico della reazione di Hayashi-Miyaura (Burgey *et al.*, 2008). Dal composto azepanonico (**10**) in poi la sintesi prosegue come già descritto nello schema precedente (Figura 7.3).

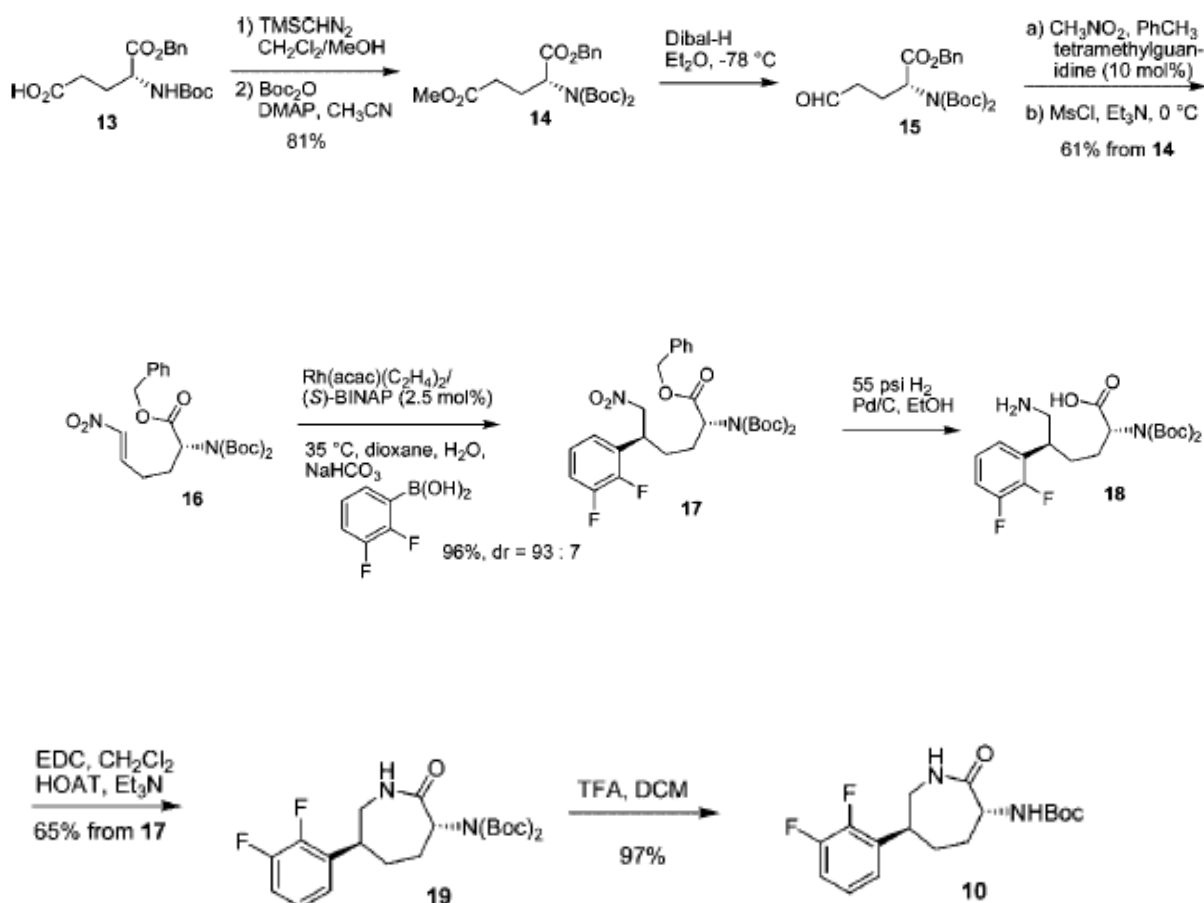


Figura 7.5. Sintesi dell'intermedio chiave **10** attraverso la reazione di Hayashi-Miyaura (Burgey *et al.*, 2008)

Conclusioni

In questo lavoro di tesi sono state discusse le funzioni, i siti in cui si trova il CGRP e il perché esso abbia un ruolo fondamentale nella fisiopatologia dell'emicrania, giungendo alla conclusione che il neuropeptide CGRP non è semplicemente un biomarker dell'attacco acuto di emicrania.

Il mio lavoro di tesi si è concentrato sulla struttura del recettore CGRP, e soprattutto su come è strutturato il complesso CLR/RAMP1 e in particolare il dominio ECD che viene considerato il sito di legame vincolante per gli antagonisti.

A causa della natura eterodimerica del recettore CGRP, c'è ancora molto da spiegare.

Un certo numero di antagonisti, oltre a Telcagepant che è il farmaco su cui mi sono più soffermata, si trovano in diverse fasi di sviluppo preclinico e clinico, ma gli studi al riguardo sono ancora molto riservati. Si può prevedere che un certo numero di composti ad esempio, BI 44370 TA che ha da poco completato le prove di fase II, saranno sviluppati a breve per competere con Telcagepant.

Questi nuovi farmaci, antagonisti del recettore CGRP, rappresentano un risultato importante per chi soffre di emicrania. L'efficacia dei nuovi antagonisti è simile a quella dei triptani senza però provocare gli stessi effetti collaterali vasocostrittori o vascolari: in questo modo ne è permesso l'uso anche quei soggetti che presentano fattori di rischio cardiovascolari. Essi inoltre non hanno effetti collaterali centrali, come sedazione o vertigini, che spesso rappresentano un problema per chi fa uso dei triptani.

Chiaramente, sono necessarie ulteriori indagini che aiutino a capire meglio la fisiopatologia dell'emicrania e la struttura del recettore per essere così in grado di sviluppare nuovi e migliori trattamenti.

Riferimenti Bibliografici

Burgey Christopher S., Paone Daniel V., Shaw Anthony W., Deng James Z., Nguyen Diem N., Potteiger Craig M., Graham Samuel L., Vacca Joseph P. e Williams Theresa M. "Synthesis of the (3R, 6S)-3-Amino-6-(2,3difluorophenyl)azepan-2-one of Telcagepant (MK-0974), a Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor Antagonist for the Treatment of Migraine Headache" *Organic Letters* (2008) Vol 10 15: 3235-3238.

Committee (2004) "The International Classification of Headache Disorders": 2nd edition. *Cephalalgia* 24 (Suppl 1) 9-160.

Congreve Miles, Langmead Christopher J., Mason Jonathan S. e Marshall Fiona H. "Progress in Structure Based on Drug Design for G Protein-Coupled Receptors" *Journal of Medicinal Chemistry* (2011) 54: 4283-4311.

Doods, H., Hallermayer, G., Wu, D., Entzeroth, M., Rudolf, K., Engel, W., et al. "Pharmacological profile of BIBN4096BS, the first selective small molecule CGRP Antagonist" *Br J Pharmacol* (2000) 129: 420-423.

Edvinsson Lars, Villalón Carlos M., MaassenVanDenBrink Antoinette "Basic Mechanisms of Migraine and Its Acute Treatment" *Pharmacology & Therapeutics* (2012) articolo in stampa.

Filla Sandra A. et al., "Novel Potent 5-HT_{1F} Receptor Agonists: Structure-Activity Studies of a Series of Substituted *N*-[3-(1-Methyl-4-piperidinyl)-1*H*-pyrrolo[3,2-*b*]pyridin-5-yl]amides" *Journal of medical chemistry* (2003) 46: 3060-3071.

Gallai, V., Sarchielli, P., Floridi, A., Franceschini, M., Codini, M., Glioti, G., et al. "Vasoactive peptide levels in the plasma of young migraine patients with and without aura assessed both interictally and ictally" *Cephalalgia* (1995) 15: 384-390.

Goadsby, P. J., Edvinsson, L., & Ekman, R. "Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache" *Ann Neurol* (1990) 28: 183-187.

Goadsby, P. J., Lipton, R. B., & Ferrari, M. D. "Migraine-current understanding and treatment" *N Engl J Med* (2002) 346: 257-270.

Goadsby, P. J. "Recent advances in understanding migraine mechanisms, molecules and therapeutics" *Trends Mol Med* (2007) 13: 39-44.

Gupta Saurabh, Villalón Carlos M. "The Relevance of Preclinical Research Models for the Development of Antimigraine Drugs: Focus on 5HT_{1B/1D} and CGRP Receptors" *Pharmacology & Therapeutics* (2010) 128: 170-190.

- Hay DL, Christopoulos G, Christopoulos A, Sexton PM “Determinants of 1-Piperidinecarboxamide, N-[2-[[5-Amino-/[[4-(4-pyridinyl)-/piperazinyl]carbonyl]pentyl]amino]-1-[3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)methyl]-2-oxoethyl]-4-(1,4-dihydro-2-oxo-3(2H)-quinazolinyl) (BIBN4096BS) affinity for calcitonin gene-related peptide and amylin receptors – the role of receptor activity modifying protein 1” *Mol Pharmacol* (2006a) 70: 1984–1991.
- Hayashi Tamio, Yamasaki Kaori “ Rhodium-Catalyzed Asymmetric 1,4 Addition and Its Related Asymmetric Reaction ” *Chemical Reviews* (2003), 103: 2829-2844.
- Hildebrandt John D. “Role of Subunit Diversity in Signaling by Heterotrimeric G Proteins” *Biochemical Pharmacology* (1997) 54: 325-339.
- Ho, T. W., Ferrari, M. D., Dodick, D. W., Galet, V., Kost, J., Fan, X., et al. “Efficacy and tolerability of MK-0974 (Telcagepant), a new oral antagonist of calcitonin gene-related peptide receptor, compared with zolmitriptan for acute migraine: a randomised, placebo-controlled, parallel-treatment trial” *Lancet* (2008) 372: 2115–2123.
- Ho, T. W., Mannix, L. K., Fan, X., Assaid, C., Furtek, C., Jones, C. J., et al. “Randomized controlled trial of an oral CGRP receptor antagonist, MK-0974, in acute treatment of migraine” *Neurology* (2008) 70: 1304–1312.
- Ho, T. W., Ferrari, M. D., Dodick, D.W., Shapiro, R. E., Diener, H. C., Lucas, S., et al. “Clinical profile of the novel oral CGRP receptor antagonist Telcagepant for the acute treatment of migraine in two phase 3 randomized placebo controlled trials” *Neurology* (2009) 72: A250.
- Hoare SRJ “Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to class B G- protein-coupled receptors” *Drug Discov Today* (2005) 10: 417–427.
- Hopkins Corey R. “ACS Chemical Neuroscience Molecule Spotlight on Telcagepant (MK-0974)” *ACS Chem. Neurosci.* (2011) 2: 334–335.
- Iovino, M., Feifel, U., Yong, C. L., Wolters, J. M., & Wallenstein, G. “Safety, tolerability and pharmacokinetics of BIBN 4096 BS, the first selective small molecule calcitonin gene-related peptide receptor antagonist, following single intravenous administration in healthy volunteers” *Cephalalgia* (2004) 24: 645–656.
- Juhasz, G., Zsombok, T., Modos, E. A., Olajos, S., Jakab, B., Nemeth, J., et al. “NO induced migraine attack: strong increase in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and negative correlation with platelet serotonin release” *Pain* (2003) 106: 461–470.
- Katzung Bertram G. “ Recettori accoppiati a proteine G” *Farmacologia Generale e Clinica* (2010) VII Edizione Piccin.
- Koth CM, Abdul-Manan N, Lepre CA, Connolly PJ, Yoo S, Mohanty AK *et al.* “Refolding and characterization of a soluble ectodomain complex of the calcitonin gene-related peptide receptor” *Biochemistry* (2010) 49: 1862–1872.

Kusano S, Kukimoto-Niino M, Akasakam R, Toyama M, Terada T, Shirouzu M *et al.* “Crystal structure of the human receptor activity-modifying protein 1 extracellular domain” *Protein Sci* (2008) 17: 1907–1914.

Kuwasako K, Kitamura K, Nagoshi Y, Cao Y-N, Eto T “Identification of the human receptor activity-modifying protein 1 domains responsible for agonist binding specificity” *J Biol Chem* (2003) 278: 22623–22630.

Kuwasako K, Kitamura K, Uemura T, Nagoshi Y, Kato J, Eto T “The function of extracellular cysteines in the human adrenomedullin Receptor” *Hyperten Res* (2003) 26: 25–31.

Lassen, L. H., Ashina, M., Christiansen, I., Ulrich, V., & Olesen, J. “Nitric oxide synthase inhibition in migraine” *Lancet* (1997) 349: 401–402.

Mallee JJ, Salvatore CA, LeBourdelle B, Oliver KR, Longmore J, Koblan KS *et al.* “Receptor activity-modifying protein 1 determines the species selectivity of non peptide CGRP receptor antagonists” *J Biol Chem* (2002) 277: 14294–14298.

Melancon Bruce J., Hopkins Corey R., Wood Michael R., Emmitte Kyle A., Niswender Colleen M., Christopoulos Arthur, Conn P. Jeffrey e Lindsley Craig W. “Allosteric Modulation of Seven Transmembrane Spanning Receptors: Theory, Practice, and Opportunities for Central Nervous System Drug Discovery” *Journal of Medicinal Chemistry* (2012) 55: 1445-1464.

Miller PS, Barwell J, Poyner DR, Wigglesworth MJ, Garland SL, Donnelly D “Non-peptidic antagonists of the CGRP receptor, BIBN4096BS and MK-0974, interact with the calcitonin receptor-like receptor via methionine-42 and RAMP1 via tryptophan-74” *Biochem Biophys Res Commun* (2010) 391: 437–442.

Miranda Les P., Holder Jerry Ryan, Shi Licheng,§ Bennett Brian, Aral Jennifer, Gegg Colin V., Wright Marie, Walker Kenneth, Doellgast George, Rogers Rick, Li Hongyan, Valladares Violeta, Salyers Kevin, Johnson Eileen e Wild Kenneth “Identification of Potent, Selective, and Metabolically Stable Peptide Antagonists to the Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) Receptor” *Journal of Medicinal Chemistry* (2008) 51: 7889-7897.

Moore EL, Gingell JJ, Kane SA, Hay DL, Salvatore CA “Mapping the CGRP receptor ligand binding domain: tryptophan-84 of RAMP1 is critical for agonist and antagonist binding” *Biochem Biophys Res Commun* (2010) 394: 141–145.

Moore Eric L. , Salvatore Cristopher A. “ Targeting a Family B GPCR/RAMP Receptor Complex: CGRP Receptor Antagonists and Migraine ” *British Journal of Pharmacology* (2012) 166: 66-78.

Olesen, J., Diener, H. C., Husstedt, I. W., Goadsby, P. J., Hall, D., Meier, U., et al. “Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN4096 BS for the acute treatment of migraine” *N Engl J Med* (2004) 350:1104–1110.

Olesen, J. “The role of nitric oxide (NO) in migraine, tension-type headache and cluster headache” *Pharmacol Ther* (2008) 120: 157–171.

Olesen Jes, Ashina Messoud “Emerging Migraine Treatments and Drugs Targets” *Trends in Pharmacological Sciences* (2011) Vol. 32 No. 6

Paone Daniel V., Shaw Anthony W., Nguyen Diem N., et al., “Potent, Orally Bioavailable Calcitonin Gene-related Peptide Receptor Antagonists for the Treatment of Migraine: Discovery of N-[(3R,6S)-6-(2,3-Difluorophenyl)-2-oxo-1-(2,2,2-trifluoroethyl)azepan-3-yl]-4-(2-oxo-2,3-dihydro-1H-imidazol[4,5-b]Pyridin-1-yl)piperidine-1-carboxamide (MK-0974) *Journal of Medicinal Chemistry* (2007) 50: 5564-5567.

Petersen, K. A., Birk, S., Lassen, L. H., Kruuse, C., Jonassen, O., Lesko, L., et al “The CGRP-antagonist, BIBN4096BS does not affect cerebral or systemic haemodynamics in healthy volunteers” *Cephalalgia* (2005) 25: 139–147.

Qi Tao, Hay Debbie L. “ Structure-Function Relationships of the N-terminus of Receptor Activity-Modifying Proteins ” *British Journal of Pharmacology* (2010) 159: 1059-1068.

Ramadan Nabih M. e Buchanan Thomas M. “New and future migraine therapy” *Pharmacology & Therapeutics* (2006) 112: 199–212.

Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Pieper H, Entzeroth M, Hallermayer G *et al.* “Development of human calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor antagonists. 1. potent and selective small molecule CGRP antagonists. 1-[N2-[3,5-dibromo-N-[[4-(3,4-dihydro-2(1H)-oxoquinazolin-3-yl)-1 piperidinyl]carbonyl]-D-tyrosyl]-L-lysyl]-4-(4-pyridinyl)piperazine: the first CGRP antagonist for clinical trials in acute migraine” *Journal of Medical Chemistry* (2005) 48: 5921–5931.

Salvatore, C. A., Hershey, J. C., Corcoran, H. A., Fay, J. F., Johnston, V. K., Moore, E. L., et al. “Pharmacological characterization of MK-0974 [N-[(3R, 6 S)-6-(2, 3-difluorophenyl)-2-oxo-1-(2, 2, 2-trifluoroethyl)azepan-3-yl]-4-(2-oxo-2, 3-dihydro-1H-imidazo[4, 5-b]pyridin-1-yl)piperidine-1-carboxamide], a potent and orally active calcitonin gene-related peptide receptor antagonist for the treatment of migraine” *J Pharmacol Exp Ther* (2008) 324: 416–421.

Simms J, Hay DL, Bailey RJ, Konycheva G, Bailey G, Wheatley M *et al.* “Structure function analysis of RAMP1 by alanine mutagenesis” *Biochemistry* (2009). 48: 198–205.

Smillie Sarah-Jane, Brain Susan D. “Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) and Its Role in Hypertension” *Neuropeptides* (2011) 45: 93-104.

Trnka Tina, Grubbs Robert H. “The Development of L2X2RudCHR Olefin Metathesis Catalysts: An Organometallic Success Story” *Accounts of Chemical Research* (2001) 34: 18-29.

Uddman, R., Edvinsson, L., Ekman, R., Kingman, T., & McCulloch, J. “Innervation of the feline cerebral vasculature by nerve fibers containing calcitonin gene-related peptide: trigeminal origin and co-existence with substance P” *Neurosci Lett* (1985) 62: 131–136.

Walker Christopher S., Conner Alex C., Poyner David R. e Hay Debbie L. “Regulation of Signal Transduction by Calcitonin Gene-Related Peptide Receptors” *Trends in Pharmacological Sciences* (2010) 31 476–483.

Williams Theresa M., Burgey Christophers, Salvatore Christophera “Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor Antagonists for the Treatment of Migraine” *Progress in Medicinal Chemistry* (2009) Vol. 47

Xu Feng, Zacuto Michael, Yoshikawa Naoki, Desmond Richard, Hoerrner Scott, Itoh Tetsuji, Journet Michel, Humphrey Guy R., Cowden Cameron, Strotman Neil e Devine Paul “Asymmetric Synthesis of Telcagepant, a CGRP Receptor Antagonist for the Treatment of Migraine” *Journal of Organic Chemistry* (2010) 75: 7829-7841.

Villalón Carlos M. e Olesen Jes “The role of CGRP in the pathophysiology of migraine and efficacy of CGRP receptor antagonists as acute antimigraine drugs” *Pharmacology & Therapeutics* (2009) 124: 309–323.

Zartman C.Blair , Bell Ian M., Gallicchio Steven N., Graham Samuel L., Kane Stefanie A., Mallee John J., Rutledge Ruth Z., Salvatore Christopher A., Vacca Joseph P., Williams Theresa M. “Identification of a Novel Ramp-Indipendent CGRP Receptor Antagonost” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2011) 21: 6705-6708.